

ZUM NACHWEIS VON SALMONELLEN
IN FUTTERMITTELN

Jochen Seydel

1482

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl für Tierhygiene
Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c. J. Kalich

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- u. Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr.h.c. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Frau Prof.Dr. B. Gedek

ZUM NACHWEIS VON SALMONELLEN IN FUTTERMITTELEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Jochen Seydel
aus
Sigmaringen

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
1. Korreferent: Prof. Dr. M. Ruf
2. Korreferent: Prof. Dr. M. Merkenschlager

Tag der Promotion: 30. Juli 1982



Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS SEITE

1.	<u>EINLEITUNG</u>	5
2.	<u>SCHRIFTTUM</u>	6
2.1.	VORKOMMEN VON SALMONELLEN IN FUTTERMITTELN	6
2.2.	METHODEN DES SALMONELLENNACH- WEISES IN FUTTERMITTELN	14
2.2.1.	VORANREICHERUNG	15
2.2.2.	HAUPTANREICHERUNG	18
2.2.3.	SELEKTIVNÄHRBÖDEN	22
2.2.4.	EINFLUSS DER PROBENGROSSE	25
3.	<u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	27
3.1.	MATERIAL UND METHODIK	28
3.1.1.	HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGS- MATERIALS	28
3.1.2.	IAG-BASISMETHODE ZUR FESTSTEL- LUNG VON SALMONELLEN IN FUTTER- MITTELN	29
3.1.2.1.	ANREICHERUNG	29
3.1.2.2.	DIFFERENZIERUNG	30
3.1.2.2.1.	BIOCHEMISCHE PRÜFUNG	31
3.1.2.2.2.	SEROLOGISCHE PRÜFUNG	35
3.1.3.	KÜNSTLICHE KONTAMINATION VON FUTTERMITTELN MIT SALMONELLEN	37

3.2.	ERGEBNISSE DER FUTTERMITTEL- UNTERSUCHUNG MIT DER IAG-BASIS- METHODE	38
3.2.1.	SALMONELLENACHWEIS IN NATÜRLICH KONTAMINIERTEN PROBEN	38
3.2.2.	NACHWEISBARKEIT VON SALMONELLEN IN KÜNSTLICH KONTAMINIERTEN PROBEN	50
3.2.2.1.	RESULTATE UNMITTELBAR NACH ZUSATZ	50
3.2.2.2.	RESULTATE NACH MEHRWÖCHIGER LAGERUNG	55
4.	<u>DISKUSSION</u>	59
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	67
6.	<u>SUMMARY</u>	69
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	71

VERZEICHNIS DER BENUTZTEN ABKÜRZUNGEN:

XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
DHL	Desoxycholat-Hydrogen-Sulfid-Lactose-Agar
TB	Tetrathionat-Bouillon
SCB	Selenit-Cystin-Bouillon

1. EINLEITUNG

Das Salmonellenproblem ist nicht neu. Bereits in der Vergangenheit hat es zahlreiche Aktivitäten gegeben, die Salmonelleninfektionen bei Mensch und Tier einzudämmen. Neu sind Überlegungen, wie die Hauptverbreitungswege der Salmonellen - Boden, Wasser, Abwasser, Schad- und Haustiere, Fäkalien, Futtermittel, Lebensmittel und Mensch - wirksam unterbrochen werden können.

Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang ein Votum des Bundesgesundheitsrates vom 2. September 1976 zum Salmonellenproblem. Der Bundesgesundheitsrat vertritt u.a. die Auffassung, daß ein wichtiger Ansatzpunkt für die Salmonellenbekämpfung die Verringerung der Ansteckungsgefahr der Nutztierbestände sei. Neben anderen Maßnahmen wird dazu auch die Dekontamination der wirtschaftsfremden Futtermittel als vordringlich angesehen.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, durch die Untersuchung einer repräsentativen Zahl von handelsüblichen Futtermitteln festzustellen, in welchem Umfang trotz inzwischen eingeleiteter Verfahren zur Bekämpfung von Salmonellen hierzulande nicht wirtschaftseigenes Futter noch mit diesen Keimen kontaminiert ist. Zugleich sollte die von der Internationalen Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung vorgeschlagene Basismethode hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit als Kontrollmethode überprüft werden.

2. SCHRIFTTUM

2.1. VORKOMMEN VON SALMONELLEN IN FUTTERMITTELN

Am Beispiel der Salmonellosen läßt sich besonders eindrucksvoll nachweisen, daß Änderungen in unserer Umwelt, wozu auch Handel und Verkehr gehören, auf die Epidemiologie nicht ohne Einfluß bleiben, und daß daher eine wirkungsvolle Seuchenprophylaxe nur dann möglich ist, wenn man den so erfolgten Wandel berücksichtigt. Vor etwa 30 Jahren begann sich, parallel zur Aktivierung des Welthandels unter Einbeziehung der Drittweltländer hierzulande und in anderen europäischen Staaten, das Spektrum der Salmonellen ganz plötzlich zu erweitern, wobei immer mehr ausgefallene, exotische Salmonella-Typen auftauchten, die man bisher nur in überseeischen bzw. fernöstlichen Regionen gefunden hatte.

Die ständig wachsende Zahl positiver Salmonellenfunde und die vermehrte Isolierung in der Bundesrepublik Deutschland völlig unbekannter Salmonella-Typen bei Tieren, sowie aus von Tieren stammenden Lebensmitteln und deren Futtermittel, führten im Jahre 1961 zur Errichtung einer Zentralstelle für veterinärmedizinische Salmonelloseforschung im Bundesgesundheitsamt. Durch systematische Erfassung aller in tierärztlichen Untersuchungsstellen im Bundesgebiet und in Westberlin vorgenommenen Salmonella-Isolierungen sollte sich diese Zentrale einen Überblick über die Epidemiologie der tierischen Salmonellosen verschaffen. Bei statistischen Auswertungen fanden die Befunde von hierzulande durchgeführten Futtermitteluntersuchungen Berücksichtigung.

Nach den Untersuchungen von RÖHR (1960), welcher innerhalb von sechs Jahren 5.066 Futtermittel auf Salmonellen unter-

suchte, hatten sich 23,6 % der Proben als kontaminiert erwiesen. ELLINGSEN u. SKOGSHOLM (1962) fanden in 380 Kokosexpellerproben 20 mal Salmonella-Spezies.

BULLING weist bereits 1962 darauf hin, daß die Importkontrollen für Futtermittel unzureichend sind; allerdings gibt es seines Erachtens noch andere Infektionswege, auf denen Salmonellen eingeschleppt werden, die nicht genügend beachtet werden. Er weist darauf hin, daß exotische Salmonella-Spezies nicht nur in tierischen, sondern auch in Futtermitteln pflanzlicher Herkunft gefunden werden. Das Auftauchen immer wieder neuer Typen steht seiner Meinung nach im Zusammenhang mit unkontrolliert eingeführtem Preßfutter, welches möglicherweise wie andere Futtermittel salmonellenhaltig sein kann.

Ergebnisse von Futtermitteluntersuchungen liegen des weiteren von SONNTAG aus dem Jahr 1962 vor. Dabei lag die Nachweisquote von pflanzlichen Futterbestandteilen relativ niedrig. Sie konnte in Fischmehl, Blutmehl und Fleischmehl keine Salmonellen nachweisen. Knochenfuttermehl und Futterknochenschrot erwiesen sich mit rund 80 % dagegen als hoch mit Salmonellen kontaminiert. Aufgrund sehr sorgfältig durchgeführter experimenteller Untersuchungen kamen JACOBS et al. (1963) zu dem Schluß, daß importierte Fischmehlpartien bei den vorgeschriebenen Stichprobenuntersuchungen fälschlicherweise als negativ beurteilt werden. Die Ursache hierfür ist in einer ungleichmäßigen Verteilung der Salmonellen im Fischmehl zu suchen. Sie konnten nachweisen, daß 26 % der Fischmehlpartien mit Salmonellen infiziert waren.

ADAMY forderte 1964, daß von Lieferländern verlangt werden soll, Fischmehl nach der Herstellung so zu lagern, daß eine nachträgliche Infektion, z.B. durch Ausscheidungen von See-

vögeln, nicht erfolgen kann. Des weiteren sollten auch Futtermittel vegetabilischer Art auf Salmonellen untersucht werden, um durch entsprechende Maßnahmen das Infektionsrisiko herabzusetzen und die Weiterverbreitung von Salmonellen mit diesen Produkten auszuschließen.

NIEDZBALLA (1966) ermittelte in den Jahren 1963 - 1964 bei 2.030 untersuchten Proben von importierten Ölprefrückständen 62 mal (3,1 %) Salmonellen. Er bestätigte damit wiederum, daß auch Futtermittel pflanzlichen Ursprungs (z.B. Luzerne-mehl) Salmonellen enthalten können.

Aus Südamerika importierte Tierkörper und knochenloses Pferdefleisch bzw. Rindfleisch war nach VAN SCHOTHORST (1967) zu 34,7 % bzw. 15,5 % mit Salmonellen kontaminiert.

Untersuchungen von 953 Fischmehlproben durch STELLMACHER u. RAUKE (1967) führten zu 3,7 % positiven Salmonella-Befunden. Sie vertreten den Standpunkt, daß bakteriologische Stichprobenuntersuchungen einwandfreie Entkeimungsmaßnahmen nicht ersetzen können, bestenfalls können sie deren Wirksamkeit kontrollieren. Ferner wird von ihnen gefordert, Fischmehl durch andere Eiweißfuttermittel zu ersetzen und führen als triftigen Grund die ungleich höhere Kontamination des Fischmehls im Vergleich zu anderen Eiweißfuttermitteln an. So lange dies aber nicht möglich ist, sollte von seiten der Veterinärbakteriologie angestrebt werden, den Salmonellennachweis im Fischmehl zu optimieren.

Nach BULLING u. PIETZSCH (1968) war bis 1964 besonders bei Fischmehlen, aber auch bei anderen Futtermitteln tierischer Herkunft ein ständiger Anstieg positiver Salmonellenfunde zu verzeichnen. Von 1964 an bis 1965 fiel die Isolierungsquote jedoch erheblich ab.

Sie vertreten die Auffassung, daß Futtermittel tierischer Herkunft wohl vielfach für die Verbreitung seltener Salmonella-Typen verantwortlich sind; als Vektor für die viel weiter verbreiteten Infektionen der Haustiere durch S.typhimurium, S.dublin und S.gallinarum-pullorum wird ihnen aber keine Bedeutung beigemessen. Glücklicherweise seien auch die Infektionswege der seltenen Salmonella-Typen nur meist kurz, denn die Infektkette reißt häufig schnell ab. Von den pflanzlichen Futtermitteln haben sich als Träger von Salmonellen vornehmlich Kokosprodukte, Baumwollsaatmehl und die Preßrückstände anderer ölhaltiger Pflanzen erwiesen. Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Kontamination eines Futtermittels und der Infektion von Haustieren läßt sich in der Regel schwer nachweisen. Ein negativer Untersuchungsbefund beweist keinesfalls, daß ein Futtermittel frei von Salmonellen war bzw. Salmonellen unterhalb der erforderlichen Infektionsdosis erhalten hat.

WESSELINOFF (1968) ermittelte dagegen bei bakteriologischen Untersuchungen, die bei aus den USA 1966 eingeführten Fleisch- und Knochenmehlen durchgeführt wurden, daß 99 (68,8 %) von 144 untersuchten Proben mit Salmonellen kontaminiert waren. Die Untersuchung von Fischmehl, Walmehl und Fleischmehl durch BISCHOFF u. RHODE (1969) ergab bei 15,6 % der Proben positive Salmonellenbefunde. Da die in Fleisch- und Fischmehl gefundenen verschiedenen Salmonella-Typen auch bei Schlachttieren und den Menschen anzutreffen sind, messen diese Autoren der Infektkette Futtermittel → Tier → Mensch besondere Bedeutung bei.

Nach dem Erlaß aus dem Jahre 1958 "Verordnung zum Schutze gegen die Gefahr der Einschleppung von Salmonellen durch Futtermittel tierischer Herkunft aus dem Ausland" untersuchte BISCHOFF (1969) 10 Jahre lang die Häufigkeitsverteilung von Salmonellen in Futtermitteln. Aus Futtermitteln konnten vor dem Erlaß

18,4 % Salmonellen isoliert werden. In der Hauptsache handelte es sich um Fischmehl, das zu 17,5 % mit den verschiedensten Keimen der Gattung Salmonella kontaminiert war. In größerem Ausmaß waren vor Inkrafttreten der Verordnung auch die Mischfuttermehle mit Salmonellen verunreinigt, die in Betrieben des Hafens hergestellt wurden. In 55 % dieser Mischmehle konnten damals Salmonellen gefunden werden. Die Quote positiver Befunde lag bei Fischmehl bei 44,7 % und Blutmehl bei 16,4 %. Im Zeitraum von März 1958 bis Februar 1968 waren es dann nur noch 5,2 % der Partien, die wegen Kontamination mit Salmonellen zurückgewiesen werden mußten.

CLARK et al. (1973) führen die Ursache der interkontinentalen Ausbreitung von Salmonella agona auf die Belieferung vieler Überseeländer mit peruanischem Fischmehl zurück. Auf eine erstmalige Isolierung dieser Spezies aus derartigem importiertem Fischmehl in den USA, England, Israel und den Niederlanden, folgte in diesen Staaten auch ein Nachweis von Salmonella agona bei Haustieren und später sogar beim Menschen. Über eine durch Salmonella agona verursachte Infektkette berichten näher KRETSCHMAR et al (1974). Nach dem Genuß von Fleisch und Fleischwaren kam es in der DDR im Jahre 1969 beim Menschen zu 457 Erkrankungen, von denen 237 Fälle als Salmonella agona-Infektionen bakteriologisch bestätigt wurden. Als Infektionsquelle wurde salmonellenkontaminiertes Fischmehl ermittelt.

Nach BULLING (1976) können die durchgeführten Stichprobenuntersuchungen keine Garantie für Salmonellenfreiheit importierter Futtermittel liefern, weil die Vorschriften für die Probenentnahme von einer homogenen Verteilung der Salmonellen ausgehen. Um jede kontaminierte Probe zu erkennen, wäre eine nicht vertretbare hohe Probenzahl erforderlich.

Diese Überlegungen führten letztlich zu der Forderung, prinzipiell Einzelfutter oder gegebenenfalls auch Mischfutter durch geeignete Behandlungsverfahren zu dekontaminieren. Nach dem FOSTER-Plan (1971) wären Futtermittel in die Risikokategorie IV einzustufen. Für diese ist vorgeschrieben, daß nach einem Zufallsprinzip 15 Stichproben zu 25 g zu ziehen sind. Bei dieser Zahl hat man nach der Statistik dann die Garantie, daß bei einer Kontamination mit 8 Salmonellen pro Kilogramm Untersuchungsmaterial 95 % der Partien mit wenigstens einer positiven Stichprobe als kontaminiert erkannt werden, wogegen 5 % der Partien als "falschnegativ" akzeptiert werden. Es erhebt sich allerdings die Frage, bis zu welchem Grad ein Importgut kontaminiert sein darf, damit es noch als "hygienisch unbedenklich" betrachtet werden kann.

Nach REUSSE (1977) existiert hierfür bisher keinerlei Vereinbarung und offensichtlich auch keine Vorstellung. Man akzeptiert nur, daß es einen unteren tolerierbaren Schwellenwert der Salmonellenverseuchung geben muß, und kennt die Problematik, daß dieser mit den bisher praktizierten Stichprobentechniken nicht immer sicher erfaßbar ist.

Es kann davon ausgegangen werden, daß bei positiven Proben in einem Kilogramm Futtermittel zwischen 100 und 1.000 Salmonellen vorhanden sind. Diese relativ geringe Kontaminationsrate ist dafür verantwortlich, daß bei Verfütterung solcher Futtermittel keine klinisch apparenten Salmonellose auftreten. Der Autor behauptet weiter, daß bedingt durch unvermeidbaren Stichprobenfehler bei über einem Drittel aller untersuchten Fischmehlpartien geringe Kontaminationen überhaupt einem Nachweis entgehen.

Die Verordnung über die Einfuhr und die Durchfuhr von Futtermitteln tierischer Herkunft und von Knochenmaterial vom

15. August 1978 verlangt gemäß Anlage 7 zu dieser Verordnung die Untersuchung der Futtermittel nach einem in jedem Fall gleichen Schema. Auf die Ergebnisse vorangehender Lieferungen wird nicht Rücksicht genommen. Diese Verordnung trat am 1. April 1979 in Kraft und regelt die Probenentnahme wie folgt: "Es sind Einzelproben im Gewicht von je etwa 25 g aus jeweils anderen Packungen und bei unverpackter Ware aus mehreren Schichten und Stellen der Ladung zu entnehmen. Vor Beginn einer Probenentnahme aus einer Sendung ist das Probenentnahmegesetz keimfrei zu machen. Die Einzelprobengefäße müssen vor der Aufnahme der Proben keimfrei sein und dichtverschlossen der Untersuchungsstelle zugeleitet werden. Die für die Probengefäße verwendeten Transportbehältnisse müssen, wenn sie nicht fabrikneu sind, vor jedem Transport gereinigt und desinfiziert werden." Für die Ermittlung der Probenzahl gelten jeweils 50 kg der Ware als eine Gewichtseinheit.

Da PIETZSCH (1978) insgesamt eine Steigerung der Salmonellenfunde in Futtermitteln verzeichnet, hält er zum einen die Erhöhung der Stichprobenzahl für bakteriologische Untersuchungen bei größeren Sendungen als dafür verantwortlich, oder aber auch eine Kontamination ursprünglich salmonellenfreier Partien durch gemeinsame Verladung und Transport salmonellenhaltiger Futtermittel (direkter Kontakt oder Staubeentwicklung). Die teilweise praktizierte Fischmehlpelletierung verhöte den Salmonellenbefall nicht, erhöht ihn vielmehr eher noch. PIETZSCH (1979) stellte dabei als bemerkenswerte Befunde heraus, daß 1977 bei Mensch und Tier 55.000 mal Salmonellen isoliert wurden, während von 1976 - 1977 ein Rückgang von 386 auf 218 Salmonella-Isolierungen aus Futtermitteln zu verzeichnen gewesen sei.

Bei in Tierkörperbeseitigungsanstalten durchgeführten Untersuchungen fand BERNIS (1979) in 28 (24,1 %) von 116 Proben Salmonellen.

ANDERSEN (1980) untersuchte die Tierkörpermehle von sieben Tierkörperbeseitigungsanstalten. Dabei wurden von 21 Proben in 5 Proben (23,8 %) Salmonellen nachgewiesen. Ebenso wies JÄNECKE (1980) in vier von 24 Tierkörpermehlproben Salmonellen nach.

Auch KEMPF u. PIETZSCH (1981) untersuchten 153 Tierkörpermehlproben aus 51 Tierkörperbeseitigungsanstalten auf das Vorkommen von Salmonellen. 41 der im Zeitraum März 1978 bis Januar 1979 untersuchten Proben (26,8 %) erwiesen sich als salmonellenpositiv.

Nach Ansicht von HESS (1979) müßte man eigentlich Epidemiologie und Prophylaxe der Salmonellosen dank der besonders leistungsfähigen Nachweis- und Typisierungsverfahren der Erreger in den Griff bekommen. Dennoch nimmt die Verseuchungsdichte mit den menschen- und tierpathogenen Serotypen, selbst in den hochzivilisierten Ländern, in denen die Hygiene weniger zu wünschen übrig läßt als in den Entwicklungsländern, ständig zu. Das wesentlichste Handikap bei der Bekämpfung der Salmonellosen beruht auf ihrem außerordentlichen breiten Infektionsspektrum. Salmonellen-Vektoren par excellence sind die Importfuttermittel, aber auch die Grünlanddüngung mit unhygienisiertem Klärschlamm sorgt für die enorme Verbreitung dieser Krankheitskeime. KAMPELMACHER (1980) stellt fest, daß Versuchen, das Salmonellenproblem einer Lösung näherzubringen, bisher kein großer Erfolg beschieden war. Zur wirk-samen Bekämpfung von Infektion und Kontamination ist eine absolute Unterbrechung des Kreislaufes an irgendeiner Stelle erforderlich. Nach dem heutigen Stand der Forschung ist hier keine befriedigende Lösung in Sicht. Zur Verteidigungsstrategie der Lebensmittelhygiene sollten einerseits die Aufzucht von Nutztieren, die frei von pathogenen Mikroorganismen (Salmonellen) sind, und andererseits die Dekontamination von Lebensmitteln und zwar vorrangig tierischer Herkunft gehören.

Noch immer nehmen nach REUSSE (1980) allerdings die Salmonellenerkrankungen des Menschen ständig zu, verursacht durch Lebensmittel, so daß umfassende Bekämpfungsmaßnahmen zwingend erforderlich wären. Er meint, daß die seit Jahrzehnten praktizierten amtlichen Einfuhruntersuchungen von Fischmehl nicht zu dem erwünschten Erfolg geführt haben.

2.2. METHODEN DES SALMONELLENNACHWEISES IN FUTTERMITTELN

Für den Salmonellennachweis in Futtermitteln sind, wie für Lebensmittel im Laufe von Jahrzehnten der Beschäftigung mit dieser Problematik, unzählige Methoden beschrieben worden, die mehr oder minder voneinander abweichen, ohne daß eine einzige Methode empfohlen werden könnte, die allen Anforderungen gerecht würde. Das liegt im wesentlichen daran, daß einerseits das Untersuchungsmaterial infolge seiner stofflichen Vielfalt, andererseits aber auch die sehr unterschiedliche Keimflora des jeweiligen Probenmaterials mancherlei Modifikationen notwendig machen.

Daneben haben Untersuchungsdauer und Untersuchungskapazität die Verfahrensweisen beeinflußt. REUSSE (1978) weist darauf hin, daß es selbst durch eine subtile Diagnostik nicht gelingen würde, der Salmonellenausbreitung Herr zu werden.

2.2.1. VORANREICHERUNG

Verfahren der Voranreicherung werden deshalb empfohlen, weil durch eine vorausgegangene Behandlung des Trägerstoffes, Gefrieren, Hitze, Eintrocknung und Bestrahlung, sowie chemische Vorbehandlung als auch Desinfektionsmaßnahmen die Salmonellen subletal geschädigt sein können, so daß sie sich einem Nachweis entziehen (ZIMMERMANN u. WERNERY, 1979). Herabgesetzte Wasseraktivität und geringer Gehalt an Sauerstoff im Substrat rufen alleine oder in Kombination mit den anderen Faktoren Stoffwechselstörungen bei diesen Enterobacteriaceen hervor und lassen die Keime in den, zur selektiven Züchtung üblichen hemmstoffhaltigen Anreicherungsflüssigkeiten nicht oder nur sehr langsam zur Entwicklung kommen (MOSSEL u. RATTO, 1970). Die subletale Schädigung der Keime wird auf Verluste von Zellbestandteilen, sowie Permeabilitätsänderungen der Zellwand und der Cytoplasmamembran zurückgeführt.

EDEL u. KAMPELMACHER (1968, 1969 und 1973) entwickelten deshalb eine Methode, mit deren Hilfe derart geschädigte Salmonellen wieder zum Leben erweckt werden können; dieser Vorgang wird als Resuscitation bezeichnet. Die von ihnen beschriebene Voranreicherung hat der bis dahin üblichen Salmonellenanreicherung voranzugehen. Es ist dazu ein nährstoffreiches Medium, wie z.B. gepuffertes Peptonwasser oder Lactose-Nutrient-Bouillon zu verwenden. Das Medium muß frei von Hemmstoffen sein und soll als spezielle Nährstoffsätze verschiedene Peptone, Fleisch- und Hefeextrakte, Pyruvate und Aminosäuren aufweisen, sowie verwertbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthalten.

VAN SCHOTHORST u. LEUSDEN (1972) wiesen nach, daß subletal geschädigte Salmonellen bei selektiver Anreicherung einen

100-fach geringeren Anwachsfaktor als ungeschädigte Salmonellen haben. Durch die Resuscitation sei es möglich, Salmonellen derart zu reaktivieren, daß sie sich in der Hauptanreicherung gegenüber einer Konkurrenzflora durchsetzen können. Von der Konkurrenzflora ausgehende negative Effekte wie Säuerung und Überwucherung wirken sich dann nicht mehr nachteilig auf den Salmonellennachweis aus.

Die gleichzeitige Durchführung der von EDEL u. KAMPELMACHER (1968, 1969, 1973 und 1974) empfohlenen Voranreicherung in zehn europäischen Laboratorien erbrachte die Überlegenheit dieses Verfahrens gegenüber einem Nachweis ohne diese Voranreicherung, denn die Quote salmonellapositiver Proben ließ sich damit von 52 % auf 95 % erhöhen.

SMITH (1977) konnte ebenfalls durch Anwendung einer Voranreicherung bei Klärschlamm- und Kotuntersuchungen die Zahl salmonellapositiver Proben von 3 % auf 85 % steigern. Bei Paralleluntersuchungen gelang REUSSE (1978) die Salmonellenisolierung bei 51 % der Proben bei Voranreicherung und nur 35 % ohne Voranreicherung. Bei Verwendung von 0,1 % Peptonwasser als Voranreicherungsmedium waren bei Geflügelschlachtkörpern sowie bei Fischmehl bessere Resultate (50 % statt 10 %) zu erzielen. Die Ergebnisse befriedigen bei Untersuchung von 10 g Fischmehl mit Voranreicherung in Bezug auf die Zahl positiver Salmonellennachweise mehr, als mit 20 g ohne Voranreicherung. Wenn 20 g Fischmehl ohne Voranreicherung und 1 g Fischmehl mit Voranreicherung untersucht werden, waren Salmonellen gleich häufig nachweisbar. Während europäische Autoren wie EDEL u. KAMPELMACHER (1973), BUIZER (1978) sowie MÜLLER (1978) gepuffertes Peptonwasser als Medium zur Voranreicherung bevorzugen, empfehlen amerikanische Autoren (THATCHER u. CLARK, 1968) dagegen Lactosebouillon.

Die bessere Eignung des lactosehaltigen Mediums wird jedoch von VAN SCHOTHORST u. LEUSDEN (1972) bezweifelt. Außer den genannten Medien kommen Nutrient-Bouillon, Trypton-Soja- oder Trypticase-Soja-Bouillon als weitere Voranreicherungsmedien in Frage. SIEMS (1974) erzielte mit Trypton-Soja-Bouillon und gepuffertem Peptonwasser höhere Isolierungsraten als mit den anderen Medien.

Über die Dauer der Voranreicherung gehen die Meinungen ebenfalls auseinander. Geringe Voranreicherungszeiten von zwei bis acht Stunden schlagen MOSSEL u. RATTO (1970), VAN SCHOTHORST et al. (1972) und SIEMS (1974) vor, während EDEL u. KAMPELMACHER (1973), PIETZSCH et al. (1975), PIETZSCH u. MULINDWA (1978) und ZIMMERMANN u. WERNERY (1979) Bebrütungszeiten von 18 - 24 h vorziehen.

MULINDWA u. PIETZSCH (1979) haben *Salmonella thyphimurium* mit anderen Enterobacteriaceen im Verhältnis 10 : 10 bis 10 : 10.000 gemischt. Unabhängig von der Ausgangskeimzahl im Inokulum zeigte sich nach 18 - 24-stündiger Inkubation des gepufferten Peptonwassers, daß alle Enterobacteriaceen-Arten eine durchschnittliche Keimzahl von 10^8 Keimen/ml erreichen. Bei einer früheren Beendigung der Voranreicherung vermindert sich in Gegenwart der raschwüchsigeren Begleitflora unter Umständen bei anschließender Selektivanreicherung damit die Chance, Salmonellen nachzuweisen. Daneben scheint nach REUSSE (1978) die Einhaltung eines bestimmten Verhältnisses zwischen Menge des eingebrachten Materials und dem Volumen des Voranreicherungsmediums (bei Futtermitteln von 1 : 15) für angebracht. Dabei sollte die Inokulummenge 100 g nicht überschreiten. Allgemein empfohlen wird ein Verhältnis von 1 : 10, d.h. 10 g zerkleinertes Material sollen auf 90 ml Voranreicherung gegeben werden.

Es gibt aber Futtermittel, für die das fünffache Volumen an Voranreicherungsmedien völlig ausreichend ist, wie z.B. bei Fischmehl.

Mitunter reicht allerdings auch einmal die 10-fache Menge Voranreicherungsflüssigkeit nicht aus, nämlich dann, wenn stark quellfähige Substanzen untersucht werden sollen.

Fast einhelliger Meinung sind die Autoren hinsichtlich der Bebrütungstemperatur: Die Voranreicherung soll bei 37° C erfolgen.

2.2.2. HAUPTANREICHERUNG

Über die Eignung von Selektivmedien zur eigentlichen Hauptanreicherung der Salmonellen liegen in der Literatur zahlreiche Berichte vor. Zur Isolierung von Salmonellen aus verdächtigem Material, welches außer Salmonellen auch andere Keime in unbekannten Mengen enthalten kann, sollten nach Möglichkeit flüssige, für Salmonellen möglichst unschädliche Medien herangezogen werden. Sie sollten so zusammengesetzt sein, daß sich die Salmonellen darin vermehren können, während die Diagnose erschwerende Begleitkeime im Wachstum gehemmt werden. Hierfür sind Anreicherungsmedien auf Tetrathionat- und Selenitbasis sehr gebräuchlich. Die besten Ergebnisse erzielten SMYSER et al. (1969) mit Selenit-Brillantgrün-Sulfa-Bouillon, GERICHTER et al. (1966) mit Selenit-Cystin-Bouillon und WOKATSCH et al. (1976) mit Selenit-Bouillon, während RADAN et al. (1970), DUNN u. MARTIN (1971), CARLSON et al. (1973), PIETZSCH et al. (1975) und VAN DEN HEEVER et al. (1977) über gute Resultate mit Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kauffmann berichten.

Bei der Gegenüberstellung der Anzahl von Salmonella-Isolierungen, die mit dem Medium auf der einen oder anderen Basis gelangen, ergaben sich praktisch keine Unterschiede hinsichtlich der Leistungsfähigkeit. TOMPKIN u. KUEPER (1972) fanden mit beiden Arten von Anreicherungsmedien nicht immer alle Serotypen, aber die Rate der salmonellenpositiven Proben stieg an, wenn sie beide gleichzeitig verwendeten. PIETZSCH et al. (1975) empfehlen, die Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kauffmann (TB) und die Selenit-Cystin-Bouillon (SCB) einzusetzen, da mit ihnen die konstantesten und gleichmäßigsten Isolierungsergebnisse erreicht wurden. Zu einem entsprechenden Ergebnis kamen HUHTANEN u. NAGHSKI (1971); sie machten aber auch die Beobachtung, daß unterschiedliche Serotypen bevorzugt aus dem einen oder anderen Anreicherungsmedium zu isolieren waren. Häufige Serotypen (Gruppe C) wurden vermehrt aus TB, während seltenere Serotypen eher aus SCB isoliert wurden. Deshalb empfehlen viele Autoren bei der Untersuchung auf Salmonellen, möglichst zwei verschiedene Anreicherungsmedien zu verwenden (MC COY, 1962; GUINÉE u. KAMPELMACHER, 1962; LEISTNER et al., 1962). Dem schließt sich auch REUSSE (1978) an, obwohl er bei Untersuchungen von Fischmehl keine Unterschiede zwischen Preuss-, Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kauffmann und einer Selenit-Bouillon erkennen konnte. BULLING u. PIETZSCH (1966) konnten bei Untersuchungen von tiefgefrorenem Schlachtgeflügel in nur 68,5 % der Fälle aus beiden Anreicherungsmedien gleichzeitig Salmonellen isolieren.

Wurde nur SCB zur Hauptanreicherung verwendet, waren nur 81,5 % der infizierten Tiere als positiv zu ermitteln, bei TB waren es dagegen 87 %. Daraus könnte eine gewisse Überlegenheit der TB gegenüber der SCB abgeleitet werden; dies trifft aber nur für einige Serotypen zu, deren Vermehrung anscheinend die TB mehr zugänglich ist.

Unterschiedliche Meinungen bestehen neben den zu verwendenden Medien auch bezüglich der Bebrütungstemperatur.

Nach Beobachtungen von HARVERY u. THOMSON (1953) ist eine Bebrütung bei 43 ° C der üblichen Bebrütungstemperatur von 37 ° C vorzuziehen. MOSSEL u. ZWART (1960) schrieben der höheren Temperatur eine weitgehende Unterdrückung der Enterobacteriaceae-Begleitflora zu. Auch CARLSON u. SNOEYENBOS (1973) sowie PIETZSCH et al. (1975) erzielten bei 43 ° C mit SCB eine höhere Salmonellennachweisquote, da Proteus, Citrobacter und coliforme Keime unter diesen Bedingungen anscheinend stark im Wachstum gehemmt werden. REUSSE (1978) teilt diese Auffassung nicht, da die Erhöhung der Bebrütungstemperatur auf 43 ° C bei seinen Untersuchungen keine Wachstumshemmung von Proteuskeimen im Anreicherungsmedium zu verzeichnen war und damit auch die Resultate nicht besser waren. Bei Fleisch- und Fischmehluntersuchungen erbrachte die Bebrütungstemperatur 37 ° C mit SCB und 43 ° C mit TB etwa gleichwertige Resultate, während 37 ° C mit TB weniger zufriedenstellte.

Des weiteren wurden von REUSSE unterschiedliche Ergebnisse je nach Inokulummenge ermittelt. Bei Verwendung von nur jeweils einem ml der Voranreicherung für die Hauptanreicherung könnte dies bei großen Probenzahlen eine nicht unerhebliche Verbilligung bedeuten. Er fand aber, daß eine Menge von 10 ml mehr positive Ergebnisse als nur ein ml erbrachte.

Eine Abimpfung auf feste Nährböden erfolgt im allgemeinen nach 18 - 24-stündiger Bebrütungszeit. Um die Ausbeute zu erhöhen, erweist es sich als vorteilhaft, sowohl nach einer Bebrütungszeit von 20 - 24 Stunden, als auch nach 45 - 48 Stunden von der Hauptanreicherung Subkulturen auf festen Selektivnährböden anzulegen.

Bei dem Versuch einer abermaligen Isolierung nach 48 Stunden erzielten REUSSE, HAFKE u. MAYER (1975) erheblich bessere Ergebnisse, als bei der Isolierung nach 24 Stunden. Dies traf besonders für die Proben zu, die, außer stark mit Salmonellen kontaminiert, eine üppige Begleitflora aufgewiesen hatten. Bei Vergleichsuntersuchungen stellten EDEL u. KAMPELMACHER (1969) bessere Isolierungsraten nach 24-stündiger Bebrütung fest, denn nur 75 % der künstlich und natürlich infizierten Proben waren nach 24 Stunden positiv. CARLSON u. SNOEYENBOS (1973) lehnen, obwohl sie keinen großen Unterschied zwischen Zeitpunkten der Isolierung fanden, wegen der Gefahr des Überwachsens durch konkurrierende Keime oder des vollständigen Verlustes lebensfähiger Zellen überhaupt eine 48-stündige Bebrütungszeit ab.

Dagegen wird eine zweite Abimpfung nach 48 Stunden von HARVEY u. PRICE (1968) und auch von EDEL u. KAMPELMACHER (1974) für notwendig gehalten.

Nach REUSSE et al. (1975) hat sich die Methode von HARREWIJN u. MOSSEL (1974) nicht bewährt. Sie stellten die Hauptanreicherung durch Übergießen der Voranreicherung mit der gleichen Menge einer doppelt konzentrierten Anreicherungsflüssigkeit her.

Ein anderes Verfahren wird von SVEUM u. HARTMANN (1977) beschrieben. Der Voranreicherung werden Wachskapseln hinzugefügt, die mit Hauptanreicherungsflüssigkeit gefüllt sind und darin sich langsam auflösen, so daß die darin enthaltene Flüssigkeit freigesetzt wird.

Das Volumen der Flüssigkeitsmenge für die Hauptanreicherung sollte mindestens 100 ml betragen, da eine Verringerung die Nachweisbarkeit herabsetzt (PIETZSCH et al., 1975).

2.2.3. SELEKTIVNÄHRBÖDEN

Für die Salmonellenisolierung aus Lebensmitteln, Kot und Futtermitteln stehen verschieden zusammengesetzte Indikator- und Selektiv-Agarnährböden zur Verfügung. Nach LANG (1963) sind an die lactosehaltigen Indikatorplatten folgende Anforderungen zu stellen:

- optimales Wachstum der Salmonellen und der Coli-Aerogenes-Bakterien;
- möglichst weitgehende Ausschaltung von sonstigem störenden Keimwachstum, besonders Hemmung des Wachstums grampositiver Bakterienarten und Unterbindung des Schwärmens von Proteus;
- ausreichende Differenzierungsmöglichkeit; Salmonellen und Enterobacter-Aerogeneskeime sollen sich durch markante Nährbodenveränderungen bzw. typische Wuchsformen voneinander unterscheiden lassen;
- gleich günstige Wachstumsbedingungen für alle Salmonella- und Escherichia coli-Typen für die volle Entfaltung ihrer antigenen Eigenschaften zur Erzielung einer zuverlässigen Agglutinabilität;
- Stabilität des Nährbodens;
- einfache Nährbodenbereitung und Erziehung gleich brauchbarer Nährbodenchargen.

Diesen Anforderungen wird unter anderen der Lactose-Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner (G) gerecht. Auf diesem Nährboden werden störende Keime wie Streptokokken, Staphylokokken und Pilze stark gehemmt oder erscheinen nur in kümmerformen; des weiteren schränkt er das Schwärmvermögen von Proteus stark ein.

Durch den Zusatz von Brillantgrün wird auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Agar (BPL) anderes Keimwachstum völlig unterbunden.

BULLING u. PIETZSCH (1966) stellten bei Untersuchungen von Schlachtgeflügel fest, daß die Ausbeute von Salmonellen auf BPL- höher als auf Gassner-Agar war.

KLIGLER (1917, 1918) entwickelte zur Identifizierung gram-negativer Darmbakterien für die Routine-Untersuchung von Stuhl und anderem Untersuchungsmaterial den Eisen-Zweizucker-Agar, der bei Zusatz von 1 % Saccharose auch als Eisen-Dreizucker-Agar bekannt ist. Der Desoxycholat-Hydrogen-Sulfid-Lactose-Agar (DHL) nach SAKAZAKI et al. (1960, 1971) dient zum Nachweis und zur Isolierung pathogener Enterobacteriaceen, insbesondere auch von Shigellen und anspruchsvollen Salmonellen in jeder Art von Untersuchungsmaterial.

Der Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) nach TAYLOR u. SCHELHART (1967, 1971) dient zur Isolierung und Differenzierung enteropathogener Bakterien, insbesondere der Spezies Shigella, Salmonella und Arizona. Nach ROLLENDER et al. (1965) ist der XLD-Agar im Direktausstrichverfahren anderen beim Nachweis von Salmonellen und Shigellen überlegen. Dieser Nährboden wird seit 1970 von der US Pharmacopoe für die Untersuchung von Arzneimitteln empfohlen. Er erwies sich bei zahlreichen Untersuchungen als ganz hervorragendes Medium, wenn er zusätzlich verwendet wird. Die Salmonellenkolonien wachsen recht charakteristisch, Proteus wird in Schwärmen völlig unterdrückt, desgleichen wird eine Reihe von Enterobacteriaceen beträchtlich im Wachstum gehemmt, und schließlich ist es leichter möglich, mit diesem Nährboden Schwefelwasserstoff produzierende Keime zu identifizieren.

Im Untersuchungsmaterial vorkommende *Proteus*-keime erschweren nach PIETZSCH (1967) häufig die Isolierung von *Salmonellen*. Sowohl *Proteus*-keime als auch *Salmonellen* greifen Lactose nicht an, auch reagieren *Proteus* spp. mit polyvalenten *Salmonellen*-Antiseren. Die zur Unterscheidung nötigen Arbeitsschritte bedeuten einen großen zusätzlichen Zeit- und Arbeitsaufwand. PIETZSCH (1967) entwickelte einen Nährboden, der das Schwärmen von *Proteus* unterdrückt und gleichzeitig eine Unterscheidung zwischen *Salmonellen* und *Proteus*-bakterien aufgrund ihres unterschiedlichen Kolonienwachstums ermöglicht. *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* und *P. morganii* bilden gelbe, fast alle *Salmonellen* blaue Kolonien. Die *Salmonellen* haben nach REUSSE u. MEYER (1972) eine charakteristische Kolonienmorphologie. Sie sind nicht kreisrund, sondern zeigen einen zerklüfteten, unregelmäßig auslaufenden Rand und dadurch eine schwach angedeutete radiäre Streifung, während die meisten coliformen Keime in völlig glatten Kolonien wachsen.

SAARMANN (1964) konnte das Ausschwärmen von *Proteus vulgaris*, unter der Einwirkung von verdampfenden 96 %-igem Alkohol, völlig unterdrücken, ohne *Salmonellen* und andere *Enterobacteriaceen* im Wachstum zu behindern; er empfiehlt dazu, in den Deckel von Petrischalen ein mit 10 Tropfen Alkohol getränktes Filterpapier zu legen. REUSSE (1978) machte schließlich die Beobachtung, daß eine Bebrütung der beimpften Elektivplatten bei 43 ° C tatsächlich jedes Schwärmen von *Proteus* auf Gassner-Platten, ja selbst auf einfachen Agarplatten verhindert und zwar ohne das Wachstum selbst negativ zu beeinflussen.

2.2.4. EINFLUSS DER PROBENGROSSE

Neben der Nachweismethode ist die Probengröße nicht ohne Einfluß auf den Züchtungserfolg. Außerdem scheint es auf die Auswahl der Proben, deren Art und Zusammensetzung, anzukommen (LENGAUER, 1978). REUSSE et al. (1975) führen an, daß bei stark kontaminiertem Material auch geringe Probenmengen ausreichen, um Salmonellen nachzuweisen, während bei sehr geringer Kontamination die Keimverteilung so ungünstig sein kann, daß ein Nachweis nicht gelingt. Man sollte deshalb das Verhältnis zwischen Volumen und Inokulummenge für die Voranreicherung nicht auf einen bestimmten Wert festlegen, sondern dieses von der Suspendierbarkeit des Materials, von den im Material vermutlich enthaltenen Hemmstoffen und von der zu erwartenden Begleitflora abhängig machen.

REUSSE (1978) hält es für einen Fehler, wenn das Bestreben dahin geht, ein möglichst großes Inokulum zur Vor- kultur in einer großen Menge Anreicherungsflüssigkeit zu suspendieren. Diese Art der Technik wird offenbar besonders von der Industrie für die Kontrolle von Rohstoffen bevorzugt. Sobald nur wenige Salmonellen im Material vorhanden sind, werden mit mehreren, kleinen parallelen Ansätzen in der Regel weniger "falsch negative" Resultate erzielt. Trotz ständiger Verbesserung der Untersuchungstechniken ist irgendwann ein Verdünnungsgrad der Keime im Untersuchungsmaterial erreicht, welcher die Nachweisbarkeit bei der Stichprobenuntersuchung in Frage stellt.

Geringgradige Kontaminationen von Futtermitteln schließen eine Weiterverbreitung von Salmonellen nicht aus (MAYER, 1978). Aus Untersuchungen von HARVEY u. PRICE (1967) und HUHTANEN u. NAGHSKI (1972) geht hervor, daß eine Abhängigkeit besteht zwischen dem Nachweis einer Kontamination

und dem Gewicht der untersuchten Proben. HARVEY u. PRICE (1967) stellten bei der Untersuchung von Tierkörpermehlproben fest, daß bei einer vierfachen Erhöhung der Probengröße (von 25 g auf 100 g) die Zahl der positiven Befunde von 15 % auf 30 % anstieg. Die Verzehnfachung des Probengewichtes von 30 g auf 300 g haben bei HUHTANEN u. NAGHSKI (1972) eine Verdoppelung der Kontaminationsquoten zur Folge (72 % statt 36 %). Bei der Überprüfung von Tiermehl mit unterschiedlich gestaffelten Gewichten der Ansätze 1 g, 10 g, 100 g und 1.000 g, steigerten KEMPF u. PIETZSCH (1981) mit den 1.000 g-Proben die Nachweisbarkeit von Salmonellen um das fast 20-fache gegenüber den 1 g-Proben und erzielten damit sogar noch eine um den Faktor zwei höhere Nachweisquote gegenüber der 100 g-Menge.

BERNS (1979) konnte um so häufiger Salmonellen nachweisen, je mehr Material pro Probe er wählte. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen Einzelanreicherungen und Sammelproben bei Untersuchungen von SILLIKER et al. (1974) und POELMA et al. (1976), während PRICE et al. (1972) mit Einzelproben bessere Ergebnisse erzielten.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen wurden in der Zeit von November 1980 bis September 1981 im Labor des Lehrstuhles für Tierhygiene der Universität München durchgeführt.

Ziel der Untersuchungen war es, die Leistungsfähigkeit der IAG-Basismethode für den Nachweis von Salmonellen in Futtermitteln, insbesondere im Fischmehl, zu überprüfen.

Die im einzelnen durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in zwei Versuchsabschnitte.

Zunächst wurden natürlich kontaminierte Futtermittel mit der IAG-Basismethode auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. Ergänzend dazu wurden Versuche angestellt, festzustellen, bis zu welcher Salmonellenkonzentration in künstlich kontaminiertem Futtermittel Salmonellen mit dieser Methode nachweisbar sind und welchen Einfluß möglicherweise darauf die Lagerungszeit hat.

3.1. MATERIAL UND METHODIK

3.1.1. HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS

Das Untersuchungsmaterial stammte zum größten Teil aus einer Futtermittelfabrik im Regierungsbezirk Schwaben/Bayern. Diese Firma stellt Futtermittel selbst her; aber sie bezieht auch fertige Futtermittel und gibt sie an den Verbraucher weiter. Die Probenentnahme erfolgte während des gesamten Untersuchungszeitraumes. Ein zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Entnahmen sollte vermeiden, daß die gleiche Charge zweimal hintereinander untersucht wurde, ferner wurden aus dem gleichen Grund solche Futtermittel zur Probeziehung ausgewählt, die schon länger lagerten und bald zum Verkauf gelangen sollten.

Jede gezogene Einzelprobe hatte ein Gewicht von etwa 0,5 kg. Die Entnahme erfolgte aus bereits abgefüllten Säcken oder aber auch aus dem Silo.

Einige untersuchte Futtermittel wurden mir auch freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, der Universität München zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Diagnostikmaterial, welches bereits in Plastiktüten zu ca. 0,5 - 1 kg abgefüllt an das Institut zur Keimgehaltsbestimmung im gleichen Zeitraum eingesendet worden war.

An dieser Stelle sei den Inhabern der Futtermittelfabrik, sowie Frau Prof. Gedek als Leiterin der Abteilung Bakteriologie und Mykologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, für die Bereitstellung der Proben recht herzlich gedankt.

3.1.2. IAG-BASISMETHODE ZUR FESTSTELLUNG VON SALMONELLEN IN FUTTERMITTELEN

Die Untersuchung von Futtermitteln auf Salmonellen wurde exakt nach der IAG-Basismethode durchgeführt, wie sie von der Internationalen Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung vorgeschlagen wird. Ein Probenaliquot von 50 g im Originalzustand wird in 2 x 25 g-Einwaagen über drei Anreicherungs-passagen und mit anschließendem Ausstreichen auf Salmonellen-Selektivnährböden untersucht. Verdächtige Isolate sind biochemisch und serologisch auf die Zugehörigkeit zum Genus *Salmonella* zu prüfen.

3.1.2.1. ANREICHERUNG

Im einzelnen wurde dabei jeweils derart verfahren, daß von jedem Futtermittel eine 50 g-Menge, in zwei 25 g-Proben unterteilt, im Verhältnis 1 : 9 zur Voranreicherung mit 0,1 %-igem Peptonwasser versetzt wurde. Diese Voranreicherung wurde in Erlenmeyerkolben mit breiter Basisfläche und einem Fassungsvermögen von 500 ml vorgenommen. Beide Proben wurden jeweils kräftig geschüttelt, nachdem sie in das bereits auf 37 ° C vorgewärmte Peptonwasser verbracht worden waren (0,1 %-iges Peptonwasser, gepuffert; Merck, Art. Nr. 7228). Diejenigen Futtermittel, die nicht in Mehlform vorlagen, mußten vorbehandelt werden. So wurden Körnerfutter oder Pellets mit einem Teil des Peptonwassers in einer sterilen Porzellanschale ca. 20 Minuten eingeweicht. Danach wurden sie mit einem Mörser bis zur mehligen Konsistenz verrieben und zu dem restlichen Peptonwasser hinzugefügt. Mit dem elektrischen Schüttler wurden sie dann noch 20 Minuten durchgemischt und kamen dann in den Brutschrank.

Die Voranreicherung dauerte 24 h und wurde bei 37 ° C durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 5 ml der aufgeschwemmten Proben in 50 ml sterile Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kauffmann (Merck, Art. Nr. 10863) überpipettiert, die in 100 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt worden war. Diese erste Hauptanreicherung wurde 18 h bei 37 ° C bebrütet. Für die zweite Hauptanreicherung wurden 5 ml der ersten Hauptanreicherung entnommen und wiederum in 50 ml sterile Tetrathionat-Bouillon überführt. Die Bebrütungstemperatur lag ebenfalls bei 37 ° C, die Bebrütungsdauer betrug dann jedoch nur noch 8 h. Danach erfolgte die Abimpfung auf feste Elektivnährböden. Zu diesem Zweck wurden von jeder Bouillonkultur der zweiten Hauptanreicherung je eine Öse Bouillon auf zwei Desoxycholat-Hydrogen-Sulfid-Lactose-Agarplatten (DHL, nach Sakazaki, Merck, Art. Nr. 11435), zwei Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agarplatten (XLD, Merck, Art. Nr. 5287) und zwei Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agarplatten nach Gassner (Merck, Art. Nr. 1282) überimpft und auf der Nährboden-Oberfläche ausgespatelt. Die Platten wurden in Petrischalen aus Glas selbst gegossen, die einen Durchmesser von 10 cm hatten. Sie wurden nach dem Beimpfen mindestens 24 h bei 37 ° C bebrütet.

3.1.2.2. DIFFERENZIERUNG

Bei Wachstum salmonellenverdächtiger Kolonien auf den Elektivnährböden wurden mittels abgeflammter, steriler Öse ein steriles Schrägröhrchen mit Standard I Nähr-Agar (Merck, Art. Nr. 1614) zur Stammhaltung und ein Schrägagarröhrchen mit Eisen-Dreizucker (Merck, Art. Nr. 1915) zur weiteren Untersuchung beimpft und diese 18 - 24 h bei 37 ° C bebrütet.

Nach Überprüfung der Reinkulturen mittels der Objektträger-schnellagglutination mit den polyvalenten Salmonellenserien I, II und III (Behring-Werke, Marburg) sowie des Wachstums und der Farbreaktionen auf dem Eisen-Dreizucker wurden im positiven Falle weitere Tests durchgeführt, von denen die nachstehenden biochemischen Reaktionen als für die Salmonellendifferenzierung brauchbar angesehen werden.

3.1.2.2.1. BIOCHEMISCHE PRÜFUNG

Ornithindecarboxylasebildung:

Durch Decarboxylierung der Aminosäure Ornithin entsteht das biogene Amin Putrescin. Durch die dabei entstehende Alkalisierung des Mediums kommt es zum Farbumschlag des Indikators Bromkresolpurpur nach violett.

Schwefelwasserstoffbildung:

Durch Zusatz von Schwermetallsalzen zu den Medien wird die Bildung von Schwefelwasserstoff aus S-haltigen Verbindungen nachgewiesen. Das Kliglermedium enthält Eisen-II-Sulfat, das sich bei H_2S -positiven Bakterien unter Bildung von Eisensulfid schwarz färbt.

Indolbildung:

Indol wird von der Aminosäure Tryptophan abgespalten. Nach Zusatz von Kovacs-Reagenz tritt ein roter Ring auf.

Adonitspaltung:

Beim bakteriellen Abbau von Adonit schlägt die Farbe des Indikators von rot nach gelb um.

Lactose-Spaltung:

Der Lactosetest dient zum Nachweis lactosevergärender Spezies. Phenolrot fungiert als Indikator. Im positiven Falle kommt es zum Farbumschlag nach gelb. Bei Salmonellen muß der Test negativ ausfallen.

Arabinosespaltung:

Hierbei wird der Arabinoseabbau durch Bakterien nachgewiesen. Bei positiver Reaktion entsteht ein Farbumschlag von rot nach gelb.

Sorbit-Spaltung:

Der Test dient dem Nachweis des bakteriellen Abbaus von Sorbit. Bei einer positiven Reaktion tritt im Nährboden eine Verschiebung des pH in den sauren Bereich ein, was sich durch die Farbänderung des Indikators von rot nach gelb zu erkennen gibt.

Bildung von Acethylmethylcarbinol (Acetoin):

Die Produktion von Acethylmethylcarbinol (Acetoin), das als Zwischenprodukt bei der Glucosefermentation gebildet wird, wird mit dem Voges-Proskauer-Reagenz nachgewiesen. Eine positive Reaktion wird durch Rotfärbung des zugegebenen Reagenz innerhalb 10 Minuten nachgewiesen.

Dulcit-Spaltung durch Phenylalanin-desaminase:

Durch das Ferment Phenylalanin-desaminase wird das im Nährmedium vorhandene Phenylalanin unter Bildung von Phenylbrenztraubensäure gespalten. Die Reaktion wird durch Grünfärbung des Nährbodens sichtbar gemacht, da Eisenammoniumcitrat im Nährboden vorhanden ist. Alle Phenylalanin-desaminase positiven Organismen sind in diesem Testsystem Dulcinit-negativ.

Harnstoffspaltung:

Wird Harnstoff hydrolytisch durch das Ferment Urease gespalten, entsteht Ammoniak, welches eine alkalische Reaktion des Nährbodens bewirkt. Dies wird wiederum durch den Indikator Phenolrot sichtbar gemacht, der sich im positiven Fall rot färbt.

Citratverwertung:

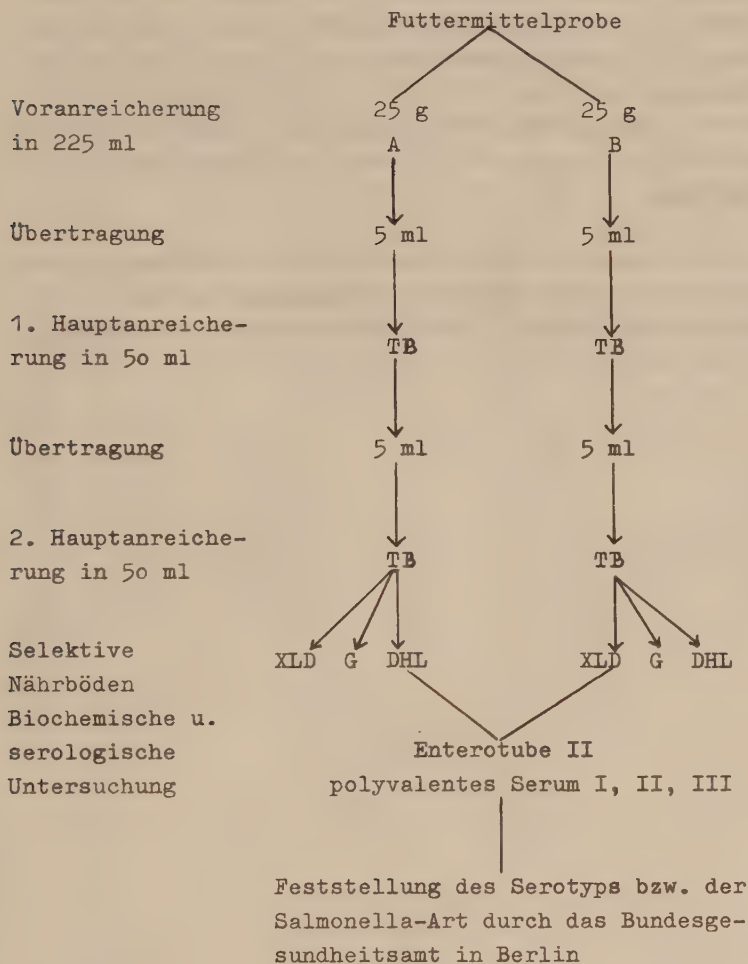
Die Nutzung von Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle wird durch Wachstum angezeigt. Die Verfärbung des Indikators Bromthymolblau nach blau gilt dabei als Wachstumsnachweis.

Zur Prüfung dieser Reaktionen wurde Enterotube II (Roche) herangezogen.

Folgende Reaktionen wurden als typisch für ein Salmonellenwachstum gewertet:

Glucosespaltung und Gasbildung:	positiv
Lysindecaboxylase-Test:	positiv
Ornithindecaboxylase-Test:	positiv
H ₂ S-Bildung:	positiv
Indolbildung:	negativ
Lactose-Spaltung:	negativ
Arabinose-Abbau:	unterschiedlich
Dulcit-Spaltung:	unterschiedlich
Sorbit-Spaltung:	positiv
Acetoin-Bildung:	negativ
Phenylalanin-desaminase-Nachweis:	negativ
Harnstoffspaltung:	negativ
Citratverwertung:	unterschiedlich

SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DES UNTERSUCHUNGSGANGES

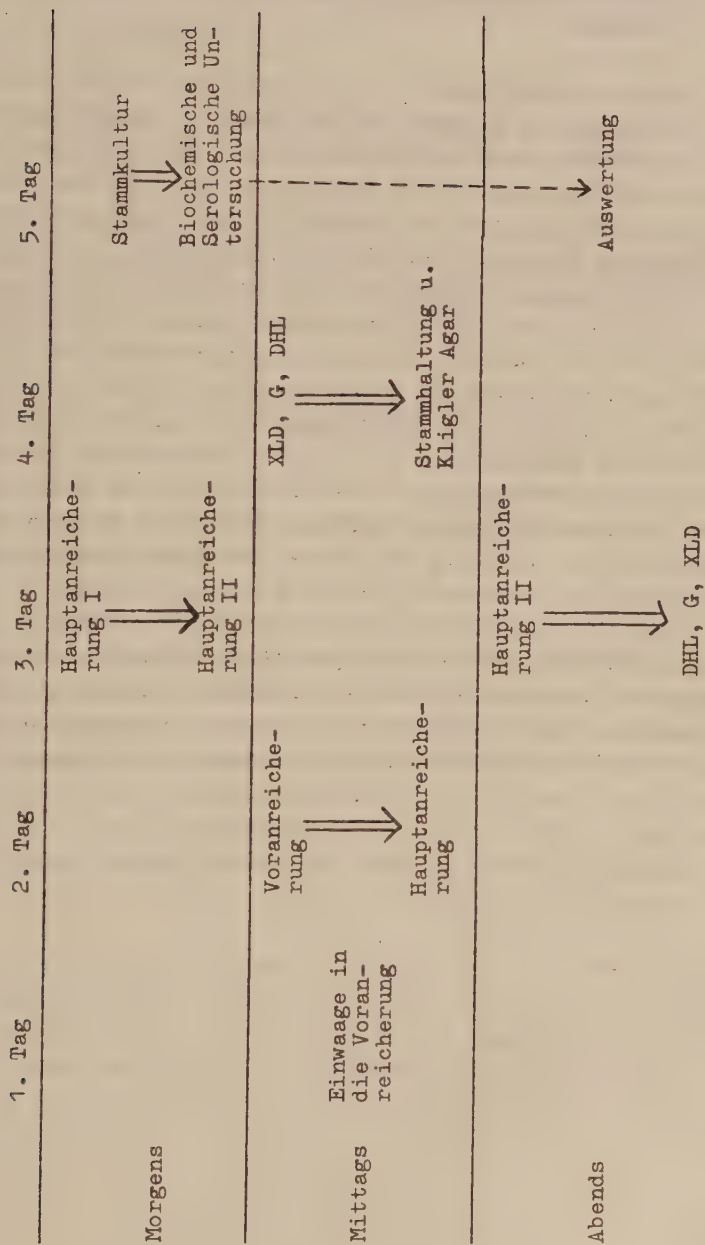


3.1.2.2.2. SEROLOGISCHE PRÜFUNG

Alle mangels spezifischer Seren nicht weiter zu bestimmenden Stämme wurden zur endgültigen Differenzierung der Zentralstelle für veterinärmedizinische Salmonelloseforschung im Bundesgesundheitsamt in Berlin (Robert von Ostertag-Institut) eingeschickt. Für die genaue Artdiagnose sei dem Robert von Ostertag-Institut deshalb an dieser Stelle vielmals gedankt.

Die nachfolgenden Schemata geben nochmals zusammenfassend einen Überblick über den Untersuchungsgang und den jeweiligen zeitlichen Ablauf der Untersuchungen der Futtermittelproben auf Salmonellen.

Schema des zeitlichen Ablaufes



3.1.3. KÜNSTLICHE KONTAMINATION VON FUTTERMITTELEN MIT SALMONELLEN

Dazu wurde das Futtermittel zuerst mit der IAG-Basismethode untersucht und für salmonellenfrei erklärt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe mit *Salmonella abortus-equi* bzw. *Salmonella gallinarum-pullorum* hergestellt und mit dem Koch'schen Plattenverfahren die Keimzahl in den hergestellten Verdünnungen festgestellt. Mit jeweils einem Milliliter dieser Verdünnungen wurden dann die Futtermittel infiziert und danach versucht, die zugesetzten Salmonellenkeime qualitativ mit der IAG-Basismethode wieder nachzuweisen. Die künstlich mit Salmonellen kontaminierten Futtermittel waren dazu in sterile Glasgefäße abgefüllt und mit Alufolie verschlossen worden. Eine qualitative Untersuchung auf Salmonellenkeime erfolgte erstmals direkt nach dem Zusatz der Keime. Alle weiteren Untersuchungen wurden im Abstand von einer Woche der Lagerung der Proben bei Zimmertemperatur durchgeführt; die längste Lagerzeit betrug 4 Wochen.

Diese zusätzlichen Untersuchungen dienten dazu, die Nachweisgrenzen und die allgemeine Leistungsfähigkeit der IAG-Basismethode noch eingehender überprüfen zu können, als es mit dem natürlich kontaminierten Probenmaterial möglich war.

3.2. ERGEBNISSE DER FUTTERMittelUNTERSUCHUNG MIT DER IAG-BASISMETHODE

3.2.1. SALMONELLENNACHWEIS IN NATÜRLICH KONTAMINIERTEN PROBEN

Es wurden insgesamt 100 routinemäßig gezogene Futtermittelproben im Doppelansatz (2 x 25 g) untersucht. Dabei wurden in sieben Proben (7 %) vier verschiedene Salmonellenarten nachgewiesen.

Salmonellen der Gruppe C: *Salmonella oranienburg* (5 x)
Salmonella eimsbuettel (1 x)

Salmonellen der Gruppe E: *Salmonella senftenberg* (2 x)
Salmonella worthington (1 x)

Nur in einem Fall, der Probe 22, wurden in beiden Ansätzen (a + b) dieser Proben Salmonellen nachgewiesen; jedoch handelte es sich hier um verschiedene Stämme (a: *Salmonella oranienburg* und b: *Salmonella worthington*). Bei allen anderen Futtermittelproben lieferte nur jeweils ein Ansatz ein positives Ergebnis. Mit dem Futtermittel Nr. 35 zeigten sich bei a und b salmonellenspezifische Reaktionen; jedoch konnten wegen Überwucherung mit *Proteus*, trotz wiederholter Bemühungen, keine Reinkultur gewonnen werden, weshalb auch auf eine serologische Bestimmung verzichtet werden mußte.

Auch bei den Proben Nummern 7, 24 a, 57, 1 a (Tab. 4) und 1 a (Tab. 4 Fortsetzung) ließen die biochemischen Reaktionen den Schluß zu, daß es sich um Salmonellen handeln müsse. Die exakte serologische Untersuchung ergab jedoch in vier Fällen *Citrobacter* spp. und bei Nummer 1 a *Klebsiella ozeanae* (Tab. 4).

Eine Übersicht über die gesamten Versuche geben die folgenden Tabellen. Die hierbei verwendeten Abkürzungen sind wie folgt zu interpretieren:

Probe Nr.	= Jede Probe ist durch Doppelansatz in a und b unterteilt.
XLD	= Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar + : salmonellenspezifische Reaktion - : salmonellenunspezifische Reaktion o : kein Keimwachstum
DHL	= Desoxycholat-Hydrogensulfid-Lactose-Agar + : salmonellenspezifische Reaktion - : salmonellenunspezifische Reaktion o : kein Keimwachstum
Lactosespaltung	= Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar nach Gassner + : Lactose positiv - : Lactose negativ o : kein Keimwachstum
Agglutination	= Agglutination mit polyvalenten Salmonellenserum I, II oder III
Test nach Kligler	= Eisen-Dreizucker-Agar nach Kligler + : salmonellenspezifische Reaktion - : salmonellenunspezifische Reaktion
Enterotube II	= Bei (+) wurde mit dem Enterotube-II-System Salmonellen nachgewiesen; bei (-) waren es andere Bakterien, die dann speziell aufgeführt sind.
Artdiagnose	= Exakte serologische Untersuchung durch das Bundesgesundheitsamt Berlin

ÜBERSICHT ÜBER DIE UNTERSUCHTEN FUTTERMITTEL

<u>Art des Futtermittels</u>	<u>Anzahl der Proben</u>
Fischmehl	56
Tiermehl	11
Gerste	4
Getreidemischfutter	3
Weizen	3
Zuchtsauenschrot	3
Hafer	2
Legehennenmehl	2
Putenmastfutter (pelletiert)	2
Rattenmehl	2
Schweinefuttermehl	2
Sojaschrot	2
Affenfutterschrot	1
Primatenpellets	1
Malzkeime	1
Katzenpellets	1
Weizenfuttermehl	1
Roggen	1
Getreideschrot	1
Haferschrot	1
insgesamt:	100

TABELLE 1: FISCHEMEHL

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggulti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a	-	-	+				
1 ^b	-	-	+				
2 ^a	-	-	+				
2 ^b	-	-	+				
3 ^a	+	+	-	+		-	
3 ^b	-	-	+				
4 ^a	-	-	+				
4 ^b	-	-	+				
5 ^a	-	-	+				
5 ^b	-	-	+				
6 ^a	-	-	+				
6 ^b	-	-	+				
7 ^a	+	+	-	+	+	+	Citrobacter sp.
7 ^b	+	+	-	+	+	+	Citrobacter sp.
8 ^a	-	-	+				
8 ^b	-	-	+				
9 ^a	-	-	+				
9 ^b	-	-	+				
10 ^a	-	-	+				
10 ^b	-	-	+				
11 ^a	-	+	+			-	
11 ^b	-	-	+				
12 ^a	-	-	+				
12 ^b	-	-	+				
13 ^a	o	o	+				
13 ^b	o	+	o				
14 ^a	-	-	+				
14 ^b	-	-	+				

TABELLE 1: FISCHMEHL (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
15 ^a b	+	+	- +	+	+	+	S. oranienburg
16 ^a b	- -	+	- +			-	
17 ^a b	- -	-	+				
18 ^a b	o +	o +	o -	+	+	+	S. oranienburg
19 ^a b	- -	-	+				
20 ^a b	- -	-	+				
21 ^a b	- -	-	+				
22 ^a b	+	+	-	+	+	+	S. oranienburg
	+	+	-	+	+	+	S. worthington
23 ^a b	- -	-	+				
24 ^a b	- o	+	+	+	+	-	Citrobacter sp.
25 ^a b	+	+	-	+	+	+	S. oranienburg
	-	-	+				
26 ^a b	- -	-	o +				
27 ^a b	- -	-	+				
28 ^a b	- -	-	+			-	
29 ^a b	- -	-	+				

TABELLE 1: FISCHMEHL (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggulti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
30 ^a b	- -	- +	+ -			-	
31 ^a b	- -	- -	+ +				
32 ^a b	- -	- -	+ +				
33 ^a b	o -	o -	o +				
34 ^a b	- -	- -	+ o				
35 ^a b	- +	+ +	- -	+ +	- -	+ +	Proteus sp. Proteus sp.
36 ^a b	- -	- -	+ +				
37 ^a b	- -	- -	o +				
38 ^a b	- +	+ +	+ -	+ +	+ +	+ +	S.senftenberg
39 ^a b	+ -	+ -	- o	+ +	+ +	+ +	S.senftenberg
40 ^a b	- -	- -	+ +				
41 ^a b	- -	- -	+ o				
42 ^a b	- -	- -	o o				
43 ^a b	- -	- -	+ +				
44 ^a b	- -	- -	+ +				

TABELLE 1: FISCHMEHL (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
45 a	-	-	+				
45 b	-	-	+				
46 a	-	+	+			-	
46 b	o	o	+				
47 a	o	o	o				
47 b	-	-	+				
48 a	-	-	+				
48 b	±	±	+				
49 a	-	-	+				
49 b	-	-	+				
50 a	+	+	-	+	+	+	S.eimsbuettel
50 b	o	o	+				
51 a	-	-	+				
51 b	-	-	+				
52 a	o	o	o				
52 b	o	o	o				
53 a	o	o	o				
53 b	o	o	o				
54 a	o	o	+				
54 b	o	o	±				
55 a	o	-	o				
55 b	o	-	o				
56 a	-	-	+				
56 b	-	-	+				
57	+	+	-	+	-	+	Citrobacter sp.

TABELLE 2: TIERMEHL

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a b	-	-	+				
2 ^a b	-	-	+				
3 ^a b	-	-	+				
4 ^a b	-	-	+				
5 ^a b	-	-	+				
6 ^a b	-	+	+			-	
7 ^a b	-	+	+				
8 ^a b	-	+	+				
9 ^a b	-	-	+				
10 ^a b	-	-	+				
11	-	-	+				

TABELLE 3: ANDERE EINZELFUTTERMITTEL

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a b G	+	+	+	-			
2 ^a b G	o	o	o				
3 ^a b G	o	o	o				
4 ^a b G	-	-	+				
1 ^a b R	-	-	+				
1 ^a b W	-	-	+				
2 ^a b W	o	o	o				
3 ^a b W	o	o	+				
1 ^a b S	-	-	+				
2 ^a b S	-	-	+				

Zeichenerklärung:

G = Gerste

R = Roggen

W = Weizen

S = Soja

TABELLE 3: ANDERE EINZELFUTTERMITTEL (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a b HS	-	-	+				
1 ^a b W	-	-	+				
1 ^a b H	o	o	o				
2 ^a b H	o	o	+				
1 ^a b M	-	-	+				

Zeichenerklärung:

HS = Haferschrot

W = Weizenfuttermittel

H = Hafer

M = Malzkeime

TABELLE 4: MISCHFUTTERMITTEL

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a b P	- o	- o	+ o		-		Klebsiella sp.
2 ^a b P	- o	- o	+ o				
1 ^a b L	- -	- -	+ +				
2 ^a b L	- -	- -	+ +				
1 ^a b S	- -	- -	+ +				
2 ^a b S	- -	- -	+ +				
1 ^a b G	- -	- -	+ +				
2 ^a b G	- -	- -	+ +				
3 ^a b G	- -	- -	+ +				

Zeichenerklärung:

P = Putenmastfutter

L = Legehennenmehl

S = Schweinefutter

G = Getreidemischfutter

TABELLE 4: MISCHFUTTERMITTEL (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnos
	XLD	DHL					
1 ^a b G	+	+	- +	+	-	+	Citrobacte
1 ^a b Z	- -	- -	+ +				
2 ^a b Z	- -	- -	+ +				
3 ^a b Z	- -	- -	+ +				
1 ^a b K	- -	- -	+ +				
1 ^a b P	- -	- -	+ +				
2 ^a b P	- -	- -	+ +				

Zeichenerklärung:

G = Getreideschrot
Z = Zuchtsauenschrot
K = Katzenpellets
P = Primatenpellets

3.2.2. NACHWEISBARKEIT VON SALMONELLEN IN KÜNSTLICH KONTAMINIERTEN PROBEN

3.2.2.1. RESULTATE UNMITTELBAR NACH ZUSATZ

Zunächst wurden Salmonellen in verschiedenen Konzentrationen salmonellenfrei befundenen Futtermitteln zugesetzt. Die Menge betrug abgestuft 3 bis $4,5 \times 10^9$ Keime pro 25 g Proben. Sie wurden sofort danach einer Untersuchung unterzogen. Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, erwiesen sich 84,6 % aller künstlich kontaminierten Proben als salmonellenhaltig. 15,4 % waren negativ, obwohl auch sie mit Salmonellen verunreinigt worden waren. Des weiteren läßt sich der Tabelle entnehmen, daß die Nachweisbarkeit anscheinend unabhängig von der Anzahl der zugesetzten Keime war, denn sogar bei hoch kontaminierten Proben (9×10^8 Keime/25 g) waren negative Resultate zu verzeichnen, während auch sehr geringe Konzentrationen (3 Keime/25 g) zu positiven Ergebnissen führten. Die Art der hauptsächlich kontaminierten Futtermittel, Fischmehl und Tiermehl, lieferten ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine Substratabhängigkeit der Nachweisbarkeit der Salmonellen mit der IAG-Basismethode.

ÜBERSICHT ÜBER ART UND ANZAHL DER KÜNSTLICH KONTAMINIERTEN
FUTTERMITTEL

<u>Art des Futtermittels</u>	<u>Anzahl der Proben</u>
Fischmehl	35
Tiermehl	9
Gerste	5
Getreideschrot	5
Haferschrot	5
Roggen	2
Malzkeime	1
insgesamt:	62

TABELLE 5: NACHWEISBARKEIT VON SALMONELLA ABORTUS-EQUI
MIT DER IAG-BASISMETHODE NACH KÜNSTLICHER
KONTAMINATION VON FUTTERMITTELN

Keimzahl der pro Probe zugesetz- ten Salmonellen	Anzahl der un- tersuchten Ein- zelproben	Nachweis	
		pos.	neg.
4,5 x 10 ⁹	1	1	
1,5 x 10 ⁹	2	2	
9 x 10 ⁸	7	5	2
8 x 10 ⁸	4	4	
4 x 10 ⁸	4	4	
1,5 x 10 ⁸	8	6	2
7 x 10 ⁷	2	2	
3 x 10 ⁷	2	2	
1,5 x 10 ⁷	2	2	
6 x 10 ⁶	2	2	
3 x 10 ⁶	6	4	2
3 x 10 ⁴	4	4	
3 x 10 ²	4	4	
3	4	3	1
insgesamt:		44	8

TABELLE 6: FISCHMEHL

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a b	+	+	-	+		+	
	+	+	-	+		+	
2 ^a b	+	+	-	+	+	+	
	+	+	-	+		+	
3 ^a b	+	±	-	+	+	+	
	+	±	-	+	+	±	
4 ^a b	+	+	-	+		+	
	+	+	-	+		+	
5 ^a b	+	+	-	+		+	
	+	+	-	+		+	
6 ^a b	±	+	-	+		+	
	±	±	-	+		+	
7 ^a b	±	+	-	+		+	
	±	+	-	±		+	
8 ^a b	+	+	-	-		+	
	±	+	-	-		-	
9 ^a b	±	+	-	±		+	
	±	+	-	±		+	
10 ^a b	+	+	-	±	+	+	
	-	+	-	±		+	
11 ^a b	-	-	o	-		-	
	±	-	±	-		-	
12 ^a b	±	+	-	+		+	
	±	+	-	+		+	
13 ^a b	±	+	-	+		+	
	±	+	-	+		+	
14 ^a b	±	+	-	±	+	+	
	±	+	-	±		+	
15 ^a b	+	+	-	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	
16	+	+	-	+	+	+	

TABELLE 7: ANDERE FUTTERMittel

Probe Nr.	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- sapltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation	Artdiagnose
	XLD	DHL					
1 ^a T	+	+	-	+	+	+	
b	+	+	-	+	+	+	
2 ^a T	+	+	-	+	+	+	
b	+	+	-	+	+	+	
3 ^a T	+	+	-	+	-	+	Citrobacter sp.
b	+	+	-	+	+	+	
4 ^a T	+	+	-	+		+	
b	+	+	-	+		+	
5 ^a T	+	+	-	+	+	+	
b	+	+	-	+		+	
6 ^a T	+	+	-	+	+	+	
b	+	+	-	+		+	
7 ^a T	+	+	-	+	+	+	
b	+	+	-	+		+	
8 ^a T	+	+	-	+	+	+	
b	-	-	o	-			
9 T	+	+	-	+	+	+	
1 ^a R	+	+	-	+		+	
b	-	+	-	+	+	+	
2 ^a R	+	+	-	+		+	
b	+	+	-	+		+	
1 ^a M	+	+	-	+		+	
b	+	+	-	-		-	

Zeichenerklärung:

T = Tiermehl

R = Roggen

M = Malzkeime

3.2.2.2. RESULTATE NACH MEHRWÖCHIGER LAGERUNG

Im letzten Versuchsabschnitt wurde versucht, nach verschiedenen Lagerungszeiten (0 - 4 Wochen) die zugesetzten Salmonellen (*Salmonella abortus-equi* und *Salmonella gallinarum-pullorum*) wiederzufinden. Dies war mit unterschiedlichen, teilweise widersprüchlichem Erfolg möglich. Bei Getreide und Getreideschrot gelang mit 84 % positiver Befunde in der ersten Woche ein zufriedenstellender Nachweis. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem, welches nach einer Woche Lagerungszeit erzielt wurde. Mit nur 17 % positiver Befunde nach einer Woche Lagerungszeit fiel das Ergebnis erstaunlich niedrig aus, dagegen erwiesen sich nach einer Lagerungszeit von zwei Wochen 50 % der Proben als salmonellenhaltig. Bei der Verwendung von Fischmehl als Substrat ließen sich grundsätzlich andere Ergebnisse erzielen. Die Nachweisquote nahm hier von anfangs 70 % kontinuierlich ab; sie betrug 50 % nach einer Woche, 38 % nach zwei Wochen, 25 % nach drei Wochen und 0 % nach vier Wochen Lagerzeit. Bei beiden Arten von Futtermitteln, sowohl bei Getreide, als auch bei Fischmehl, waren vier Wochen nach der künstlichen Kontamination allerdings keine Salmonellen mehr nachweisbar. Wären die Futtermittel nicht jeweils zweifach angesetzt und damit doppelt untersucht worden, würde die Nachweisquote der zugesetzten Salmonellen noch niedriger gelegen haben.

TABELLE 8: NACHWEISBARKEIT VON SALMONELLEN IN
KÜNSTLICH KONTAMINIERTEN FUTTERMITTELEN
MIT DER IAG-BASISMETHODE

Probe Nr.	Lagerzeit in Wochen	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation
		XLD	DHL				
1 ^a G _b	0	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{+}{+}$		$\frac{+}{+}$
2 ^a Ge _b	0	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{+}$	+	$\frac{+}{+}$
3 ^a H _b	0	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{-}{o}$	+		$\frac{+}{+}$
4 ^a F _b	0	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$
5 ^a F _b	0	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{-}{o}$	+	+	+
6 ^a F _b	0	$\frac{-}{+}$	$\frac{-}{+}$	$\frac{+}{-}$	+	+	+
7 ^a F _b	0	$\frac{-}{+}$	$\frac{-}{+}$	$\frac{+}{-}$	+	+	+
8 ^a G _b	1	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{-}{o}$	+		+
9 ^a Ge _b	1	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{+}{+}$			
10 ^a H _b	1	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{+}{+}$			
11 ^a F _b	1	$\frac{-}{+}$	$\frac{-}{+}$	$\frac{+}{-}$	+	+	+

Zeichenerklärung: G = Gerste
Ge = Getreideschrot
H = Haferschrot
F = Fischmehl

TABELLE 8: NACHWEISBARKEIT VON SALMONELLEN IN
KÜNSTLICH KONTAMINIERTEN FUTTERMITTELN
MIT DER IAG-BASISMETHODE (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Lagerzeit in Wochen	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Enter- tube II	Aggluti- nation
		XLD	DHL				
12 ^a _b F	1	+	+	-	+	+	+
		+	+	-	±	+	+
13 ^a _b F	1	-	-	+			
		+	+	-	±	+	+
14 ^a _b F	1	-	-	+			
		-	-	+			
15 ^a _b G	2	±	±	-	+		+
		-	±	-	+		+
16 ^a _b Ge	2	±	±	-			-
		-	±	-			-
17 ^a _b H	2	±	-	-	±		+
		-	-	-	-		-
18 ^a _b F	2	+	+	-	-		-
		-	+	-	-		-
19 ^a _b F	2	+	+	-	+	+	+
		+	+	-	+	+	+
20 ^a _b F	2	+	+	-	+	+	+
		+	+	±	±		-
21 ^a _b F	2	-	-	+			
		-	-	+			
22 ^a _b G	3	-	+	-			-
		±	+	-			+
23 ^a _b Ge	3	±	-	+			
		-	-	+			

Zeichenerklärung: G = Gerste
Ge = Getreideschrot
H = Haferschrot
F = Fischmehl

TABELLE 8: NACHWEISBARKEIT VON SALMONELLEN IN
KÜNSTLICH KONTAMINIERTEN FUTTERMITTELN
MIT DER IAG-BASISMETHODE (FORTSETZUNG)

Probe Nr.	Lagerzeit in Wochen	Spez. Enzym- reaktionen		Lactose- spaltung	Test nach Kligler	Entero- tube II	Aggluti- nation
		KLD	DHL				
24 ^a _b H	3	-	-	+			
25 ^a _b F	3	+	+	-	+	+	+
26 ^a _b F	3	-	+	+			-
27 ^a _b F	3	+	+	-	+	+	+
28 ^a _b F	3	-	-	+			
29 ^a _b G	4	-	-	o			
30 ^a _b Ge	4	-	-	-			-
31 ^a _b H	4	-	-	+			
32 ^a _b F	4	-	-	+			
33 ^a _b F	4	o	o	+			
34 ^a _b F	4	-	-	+			
35 ^a _b F	4	-	-	+			

Zeichenerklärung:

G = Gerste

Ge = Getreideschrot

H = Haferschrot

F = Fischmehl

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 100 willkürlich unter Praxisbedingungen gezogene und 62 künstlich kontaminierte Futtermittelproben untersucht. Die mikrobiologische Untersuchung erfolgte nach der IAG-Basismethode mit Voranreicherung. Während des ersten Versuchabschnittes, der Untersuchung von insgesamt 200 25 g-Proben gegebenenfalls natürlich kontaminierten Futtermittel, konnten nur in Fischmehl Salmonellen nachgewiesen werden. Bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Futtermittel erwiesen sich damit 7 % als salmonellenpositiv; findet nur Fischmehl Berücksichtigung, dann waren 12,5 % positiv. Es handelte sich bei den nachgewiesenen Salmonellen um vier verschiedene Spezies, die insgesamt achtmal auftraten. Häufig wurde *S. oranienburg* (fünf Einzelproben) nachgewiesen, gefolgt von *S. senftenberg* (zweimal); *S. worthington* und *S. eimsbuettel* lagen nur jeweils einmal vor. Die Ergebnisse stimmen mit denen von BULLING u. PIETZSCH (1968) überein, die feststellten, daß *S. oranienburg*, *S. senftenberg* und *S. worthington* hauptsächlich im Fischmehl vorkommen, während *S. eimsbuettel* auf kein bestimmtes Futtermittel spezialisiert zu sein scheint. Die Nachweisquote liegt im Bereich der Ergebnisse zahlreicher anderer Untersuchungen. So erhielten BISCHOFF (1969) 5,2 %, JACOBS et al. (1963) 26 % und STELLMACHER u. RAUKE (1967) 3,7 % positive Ergebnisse bei Fischmehluntersuchungen; außerdem ist es nicht ungewöhnlich, daß in den anderen Futtermitteln keine Salmonellen nachgewiesen wurden, wenn auch bei Tiermehl des öfteren Salmonellenfunde beschrieben werden (BERNS 1979, ANDERSEN 1980, JÄNECKE 1980). KEMPF u. PIETZSCH (1981) kamen bei 26,8 % der Untersuchungen von Tierkörpermehlen zu einem positiven Ergebnis.

Als unerlässlich muß der zweifache Ansatz von jeweils 25 g eines zu untersuchenden Futtermittels angesehen werden. Wäre bei den eigenen Untersuchungen nur eine 25 g-Probe untersucht worden, so wäre unter Umständen nur eine einzige Fischmehlprobe als salmonellenhaltig erkannt worden, da nur hier beide Ansätze positiv waren. Als Ergebnis dieser Untersuchungen ist vor allem herauszustellen, daß in der Routineuntersuchung jeweils auf die Untersuchung von 2 x 25 g Probenmaterial zu achten ist, da anscheinend nur so ein höheres Maß an Treffsicherheit beim Salmonellennachweis zu erzielen ist.

Die Eignung von TB zur Hauptanreicherung, wie dies auch den Versuchsergebnissen von BULLING u. PIETZSCH (1966), CARLSON u. SNOEYENBOS (1973) und JÄNECKE (1980) entnommen werden kann, bestätigte sich nach den eigenen Untersuchungen. Nach der Anzahl der Isolierungen ist TB der SCB überlegen. Dies beruht möglicherweise auf einer stärkeren Unterdrückung der Begleitflora, die insbesondere bei salmonellenhaltigen Proben in nicht unbeträchtlichem Maße vertreten sein kann.

Zur Optimierung der Ergebnisse wäre es vielleicht jedoch vorteilhaft, parallel zu TB als zweites Hauptanreicherungsmedium SCB zu verwenden (BULLING u. PIETZSCH 1966, HUHTANEN u. NAGHSKI 1972), was den technischen Aufwand allerdings noch erhöhen würde.

Durch den jeweiligen Doppelansatz einer Probe und mit der Vorschaltung einer Voranreicherung mit gepuffertem Peptonwasser stellt diese Untersuchungsmethode ein aufwendiges, kostspieliges und besonders zeitraubendes Nachweisverfahren dar, das allerdings durch das zweite Hauptanreicherungsmedium und einer zweiten Abimpfung nach 48 Stunden in der neueren Literatur als die derzeit aussichtsreichste Methode zur Aufdeckung von Salmonellenkontaminationen angesehen wird.

EDEL u. KAMPELMACHER (1968, 1969, 1973, 1974), DUNN u. MARTIN (1971), TAYLOR u. SCHELHARDT (1971), VAN SCHOTHORST u. VAN LEUSDEN (1972), POLLOCK u. DALGREN (1974), PIETZSCH et al. (1978), STRAUCH et al. (1977) und REUSSE et al. (1978) bestätigen die Notwendigkeit einer Voranreicherung, da sie damit häufiger Salmonellen als mit bloßem Direkt-ausstrichverfahren nachweisen konnten. Ein Unterschied in der Leistungsfähigkeit zwischen den festen Nährböden XLD, DHL, Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar nach Gassner und Kligler-Agar hinsichtlich des qualitativen Nachweises von Salmonellen konnte nicht festgestellt werden.

Bei allen salmonellenpositiven Proben reagierten die Nährböden einheitlich salmonellenspezifisch. Jedoch wird aus der Erfahrung dieser Versuche heraus dringend davor gewarnt, eine Probe, bei der alle Nährböden positiv reagieren, als salmonellenhaltig zu bezeichnen, ohne den Enterotube II-Test bzw. die Probeagglutination durchgeführt zu haben. So kann es durchaus sein, daß trotz positiver Reaktionen bzw. vorhandener Agglutination, es sich nicht um Salmonellen handelt (s. Tabelle 1, Probe Nr. 7, 24, 35 und 57). In diesen Fällen gab die Verwendung des Enterotube II-Testsystems verläßlich Auskunft darüber, ob die Keime der Gattung Salmonella zuzuordnen waren oder ob nicht. Wegen der nicht unerheblichen Mehrkosten sollte allerdings Enterotube II nicht bei jeder Routineuntersuchung, sondern nur in Zweifelsfällen unbedingt angewendet werden, um eventuelle Fehlinterpretationen auszuschließen. Mitteilungen über extrem hohe Kontaminationszahlen, wie sie in der Literatur hin und wieder auftauchen, sind demzufolge vorbehaltlich einer entsprechenden Absicherung des Untersuchungsergebnisses auch als akzeptabel anzusehen.

Die Resultate der eigenen Untersuchungen hätten vermutlich noch durch Anlegen einer zweiten Subkultur auf festen Nährböden nach 48-stündiger Bebrütung der Hauptanreicherung verbessert werden können, worauf TAYLOR (1961), EDEL u. KAMPELMACHER (1973) und REUSSE (1978) hinweisen.

Eine wichtige Rolle bei der Futtermitteluntersuchung auf Salmonellen spielen anscheinend Bebrütungsdauer und -temperatur der verwendeten Vor- und Hauptanreicherungsmedien oder aber auch die Art des Nährbodens und dessen richtige Auswahl. Deshalb sind direkte Vergleiche nur bei Anwendung des gleichen Verfahrens und unter Voraussetzung gleicher Versuchsbedingungen möglich. Gleiche Versuchsbedingungen strebten EDEL u. KAMPELMACHER (1974) bei der Durchführung von Untersuchungen in mehreren europäischen Laboratorien an, deren Ergebnisse dann auch keine größeren Abweichungen voneinander zeigten. Hierbei wurden jedoch u.a. andere Hauptanreicherungsmedien und Differentialnährböden als in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Während des zweiten Versuchabschnitts wurden Futtermittel mit zwei Salmonella-Arten in verschiedenen Konzentrationen künstlich kontaminiert. Ziel dieser Untersuchungen sollte sein, festzustellen, in welchem Keimzahlbereich ein Salmonella-Nachweis mit der IAG-Basismethode möglich ist, bzw. bis zu welcher Grenzkonzentration dieser noch gelingt. Die pro Probe zugesetzten Keimzahlen schwankten dabei zwischen 3×10^0 und $4,5 \times 10^9$ Keime/25 g Futtermittel. Generell gelang es, 84,6 % der künstlich kontaminierten Proben als salmonellenhaltig zu bestimmen. Aus der Tabelle 5 ist ersichtlich, daß negative bzw. positive Resultate unabhängig von der jeweiligen Infektionsdosis erzielt wurden.

Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß für das Untersuchungsergebnis bei Anwendung der IAG-Basismethode die Keimzahl von nicht entscheidender Bedeutung ist. EDEL u. KAMPELMACHER (1974) berichten, daß, wenn von mehreren Laboratorien künstlich kontaminierte Proben mit einer standardisierten Methode untersucht wurden, 98,2 % als positiv erkannt wurden. Benützten die Untersuchungsstellen jedoch ihre laboreigene Methode, so kamen sie nur auf 78,5 % positiver Proben. Auch wurden mit abnehmenden Salmonellenkonzentrationen weniger Proben als positiv ermittelt, besonders wenn zur Untersuchung eine laboreigene Methode zur Anwendung kam. Die IAG-Basismethode verdient, als standardisiertes Nachweisverfahren eingestuft zu werden, da das Spektrum der Nachweise sich sehr gleichmäßig über das unterschiedlich hoch kontaminierte Untersuchungsmaterial verteilte. REUSSE (1978) meint allerdings, daß für die Leistungsfähigkeit eines Nachweisverfahrens nicht allein die hohe Nachweisquote von Bedeutung ist, sondern es hat auch dem Sachverhalt Rechnung zu tragen, daß im Untersuchungsmaterial unterschiedlich verteilte und subletal geschädigte Salmonellenkeime vorliegen können. Er rät deshalb, verschiedene Nachweismethoden den Erfordernissen entsprechend zu kombinieren. Es ist dies natürlich schwer mit dem Bestreben nach einer bundeseinheitlichen oder sogar in Europa anzuwendenden Standardmethode in Einklang zu bringen.

Die eigenen Untersuchungen von künstlich kontaminierten Futtermitteln, die verschieden lang gelagert wurden, erbrachten mit der IAG-Basismethode nicht immer zufriedenstellende Ergebnisse. Wenn die, mit 2×10^5 bzw. 4×10^5 Salmonellenkeimen kontaminierten Proben nach 1 - 4 Wochen Lagerzeit untersucht wurden, sank nach anfänglichen 70 % bzw. 84 % positiver Nachweise die Quote auf 0 % ab. Dies ist um so mehr verwunderlich, als in der Literatur des öfteren von monate- bzw. jahrelangen Lagerzeiten berichtet

wird und trotzdem noch Salmonellen gefunden wurden. Da bei den eigenen Untersuchungen stets dasselbe Verfahren angewendet wurde, kam dieses Ergebnis nicht auf die Methode, sondern muß auf die Salmonellen selbst zurückgeführt werden. Da die künstlich kontaminierten Futtermittel während der Sommermonate bei Zimmertemperatur gelagert wurden, ist ein Absterben der Keime eventuell durch Austrocknung denkbar, aber nicht sehr wahrscheinlich. Ebenso überrascht die starke Abnahme der Nachweisquote innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes. Für diese Ergebnisse konnten keine befriedigenden Antworten gefunden werden, da das standardisierte und nicht manipulierte Verfahren dafür nicht Ursache sein kann. Die Brauchbarkeit der Methode dürfte durch die Nachweisbarkeit der eingepfachten Keime in den ersten Wochen der Lagerung hinreichend bestätigt sein.

Bei Berücksichtigung der Art der untersuchten Futtermittel fällt auf, daß nur bei Fischmehl Salmonellen nachgewiesen werden konnten.

Auch durch das Bundesgesundheitsblatt (1979) wird dies bestätigt, zugleich ist ein allgemeiner Rückgang in der Zahl von Salmonellenisolierungen bei Futtermitteln zu verzeichnen.

Es ist allerdings überraschend und nicht unbedenklich, daß trotz der modernen Produktionsmethoden heute noch in 12,5 % der Fischmehlproben Salmonellen nachgewiesen wurden. Da es sich bei dem salmonellenhaltigen Material um Proben aus einer Mischung handelte, welche aus Fischmehlen aus Peru, Norwegen und Island in Hamburg zusammengestellt worden war, kann das eigentliche Ursprungsland nicht mehr festgestellt werden. Bei der Verfütterung waren nach Mitteilungen der Landwirte an den Verkäufer auch vermehrt Durchfälle in Schweinemastbetrieben aufgetreten.

Daß alle anderen Futtermittel als salmonellenfrei befunden wurden, läßt sich mit der hochtechnisierten und daher meist sehr hygienischen Produktion hierzulande erklären. Möglicherweise wäre bei einer Erhöhung der Probenzahl die Nachweisquote für die natürliche Kontamination der untersuchten Futtermittel höher gelegen, denn für Tiermehl wird dies von mehreren Autoren (BERNS 1979, ANDERSEN 1980, JÄNECKE 1980) beschrieben.

Trotz der routinemäßigen Kontrolle läßt sich, wie auch die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigen, die Einschleppung von Salmonellen nicht vermeiden. KAMPELMACHER (1967) meint dazu, daß selbst bei Einführung einer standardisierten Methode andere Unzulänglichkeiten von Einfluß auf das Isolierungsergebnis sein dürften.

Deshalb stellt sich auch hier die Frage nach der prophylaktischen Dekontamination. Bei der Pelletierung von Futtermitteln, der allerdings noch immer teuersten Dekontaminationsmöglichkeit, tritt nach FRIEDRICH (1977) bei 75 ° C bis 80 ° C innerhalb von fünf Minuten eine deutliche Bakterienreduzierung ein. Wirtschaftlich tragbar erscheint die Strahlenpasteurisierung von kontaminierten Futtermitteln. GIESE et al. (1976) stellten jedoch erhöhte Mitozeraten nach Verfütterung derartig behandelter Futtermittel im Darmtrakt von Tieren fest, deren Ursache durch weitere Versuche geklärt werden muß. Da wirtschaftlich und wohl auch zuverlässig, wird von REUSSE (1977) und TIEFENBACHER (1977) die Propionsäurezumischung befürwortet, was jedoch wiederum PIETZSCH (1976) als zu unsicher ablehnt. BULLING u. PIETZSCH (1968) sehen es als sicherste Methode an, durch Pasteurisierung oder einer anderen gleichwertigen Behandlung Salmonellen aus den Futtermitteln zu eliminieren. Derartige Verfahren sind

aber für die Landwirtschaft der Bundesrepublik Deutschland, die zur Deckung ihres Bedarfs an Eiweißfuttermitteln größtenteils auf Importe angewiesen ist, aus Kostengründen zur Zeit kaum durchführbar.

Es muß deshalb bei der Forderung bleiben, den weiteren Zufluß von Salmonellen über infizierte ausländische Futtermittel zu verhindern oder wenigstens erheblich zu verringern, indem die Einfuhrgenehmigung von einem ausreichenden hygienischen Allgemeinzustand der Ware abhängig gemacht wird.

Um dies zu kontrollieren, steht mit der IAG-Basismethode ein durchaus leistungsfähiges Nachweisverfahren zur Verfügung, das geeignet ist, Salmonellenkontaminationen von Futtermitteln aufzuzeigen, wenn auch der zeitliche und technische Aufwand nicht gering ist und in Betracht gezogen werden sollte, daß mitunter Hauptanreicherung und anschließende Differenzierung in Anpassung an den jeweiligen Sachverhalt einer gewissen Modifizierung bedürfen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 100 unter Praxisbedingungen gezogene Futtermittel mit der IAG-Basismethode, und zwar je Probe zweimal eine 25 g-Menge, untersucht. Es handelte sich dabei in erster Linie um Fischmehl, sowie um andere Einzelfuttermittel und um Mischfutter.

7 % der untersuchten Proben erwiesen sich als salmonellenpositiv. Die achtmal nachgewiesenen Salmonellen ließen sich vier verschiedenen Salmonellen-Arten zuordnen und zwar: *S. oranienburg*, *S. senftenberg*, *S. worthington* und *S. eimsbuettel*.

Außerdem wurde die Leistungsgähigkeit des Verfahrens noch durch künstliche Kontamination von zuvor als salmonellenfrei befundenen Futtermittel überprüft. Die den Futtermitteln zugesetzten Keimzahlen schwankten dabei zwischen 3×10^0 und $4,5 \times 10^9$ Salmonellen/25 g Futtermittelprobe. Bei Anwendung der IAG-Basismethode betrug die Wiederfindungsrate 84,6 % der künstlich kontaminierten Proben ($n = 52$). Eine Korrelation zwischen Keimzahl und Art des Futtermittels ergab sich dabei in Bezug auf die Nachweisbarkeit der Salmonellen in den künstlich kontaminierten Proben nicht.

Die ergänzend dazu durchgeführte Untersuchung der künstlich kontaminierten Futtermittel nach verschiedenen Lagerungszeiten (ein bis vier Wochen) lieferte uneinheitliche und dadurch nicht leicht zu interpretierende Ergebnisse.

In den ersten zwei Wochen lag die Nachweisquote bei 70 % bzw. 84 %, aber nach einer Lagerungszeit von 4 Wochen betrug sie bereits 0 %.

Da sich die IAG-Basismethode bei den vorangegangenen Versuchen als zufriedenstellend erwiesen hat, dürften diese negativen Resultate nach einer Lagerungszeit von 4 Wochen auf ungünstige Milieueinflüsse während der Lagerung (bei Zimmertemperatur) zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die von der Internationalen Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung vorgeschlagene Basismethode geeignet ist, Futtermittel auf Salmonellenfreiheit zu untersuchen. Es muß allerdings in Kauf genommen werden, daß der technische und zeitliche Aufwand nicht unerheblich ist. Eine zusätzliche Hauptanreicherung in SCB und eine abermalige Überimpfung der Keime nach 48 Stunden von den Hauptanreicherungsmedien auf die entsprechenden Differentialnährböden könnte nach den im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen möglicherweise die Nachweisbarkeitsquote erhöhen und damit zu einer größeren Treffsicherheit führen. Somit ließe sich die Leistungsfähigkeit des Verfahrens womöglich noch verbessern.

6. SUMMARY

One hundred samples of feeding-stuffs - grown under practice conditions - were examined with the IAG-basis method, namely twice a quantity of 25 g per sample. It was primarily fish-meal as well as some other single feedstuffs and mixed-feed.

7 % of the examined samples proved to be salmonellae positive. The salmonellae detected eight times, could be classified into four different salmonellae species as follows: S. oranienburg, S. senftenberg, S. worthington and S. eimsbuettel.

Besides, the efficiency of this method was examined by artificial contamination of the feedstuffs, these have been before found free of salmonellae. The counts of salmonellae - added to the feeding-stuffs - varied then between 3×10^0 and $4,5 \times 10^9$ salmonellae per 25 g sample. The detection rate was 84,6 % of the artificially contaminated samples ($n = 52$), when the IAG-basis method was used. Relating to the evidence of salmonellae in the artificially contaminated samples there was no correlation between the numbers of germs and the nature of the feeding-stuff.

The additional investigation of the artificially contaminated feedstuffs after different storage periods (one to four weeks) supplied irregular results, which were consequently not very easy to interpret.

During the first two weeks the evidence rate were 70 % and 84 % respectively, but after a storage period of four weeks it was already 0 %.

As the IAG-basis method has proved to be satisfactory during the preceding tests, these negative results after a storage period of four weeks could be explained by disadvantageous

environmental influences during the storage (at room temperature).

From these results it can be concluded that the basis method - proposed by the 'Internationale Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung' - is appropriate to examine if feeding-stuffs are free of salmonellae. But it must be accepted that the technical expenditure and the time factor are considerable. According to the experiences gained within the limits of this work, an additional main enrichment in SCB and renewed over - inoculation of germs - from the main enrichment media to the corresponding differential culture media after 48 hours - could possibly increase the evidence rate and thus lead to a greater accuracy. This way the efficiency of this method could possibly be improved.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMY, L.

1964

"Hat sich die VO zum Schutze gegen die Gefahr der Einschleppung von Salmonellen durch Futtermittel tierischer Herkunft aus dem Ausland vom 8. Februar 1958 bewährt?"

Vet. Med. Diss. Gießen

ANDERSEN, J.-P.

1980

Untersuchungen über die Kontamination von Tierkörpermehlen mit Salmonellen.

Vet. Med. Diss. Hannover

BÄNFFER, J. R.

1971

Comparison of the isolation of Salmonellae from human faeces by enrichment at 37 ° C and 43 ° C.

Zbl. Bakter. I. Orig. 217,35

BERNS, H.

1979

Untersuchungen über die Kontamination einer Tierkörperbeseitigungsanstalt mit Salmonellen.

Vet. Med. Diss. Hannover

BISCHOFF, J. u. R. RHODE

1956

Salmonellen in Fisch- und Fischmehlen ausländischer Herkunft.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 68,307

BISCHOFF, J.

1969

10 Jahre Untersuchungen von Futtermitteln tierischer Herkunft auf Befall mit Keimen aus der Salmonella-Gruppe.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82,193

BUIZER, F. G. 1978

Erfahrungen zur Isolierung von Salmonellen aus Futtermitteln.

Referat, Arbeitstagung der Internationalen Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung in München, 1978

BULLING, E. 1962

Verbreitung und Bedeutung der Tiersalmonellosen in der BRD. Bericht des 5. Kongresses der dt. vet. med. Gesellschaft, Bad Nauheim, April 1961, S. 216

BULLING, E. u. O. PIETZSCH 1966

Beiträge zur Salmonella-Diagnostik.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 13, 246

BULLING, E. 1968

Ergebnisse und Schlußfolgerungen aus 5-jährigen Salmonellose-Untersuchungen (1961 - 1965).
Zbl. Vet. Med. B. 2, 61

BULLING, E. 1976

Infektionsquellen für das Tier.
Bundesgesundheitsbl. 19, 137

CARLSON, L. 1973

Comparative effectiveness of the selenit and tetrathionat enrichment broths for the isolation of Salmonella-serotypes.
J. Am. Vet. Med. Ass. 163, 1198

CARLSON, L., L. VIRGINIA
u. G. H. SNOEYENBOS 1974

Comparative efficiencies of selenit and tetrathionat broths for the isolation of Salmonella-serotypes.
Am. J. Vet. Res. 35, 711

CLARK, G. M., A. F. KAUFFMANN, E. J. GANGAROSA
u. M. A. THOMPSON 1973

Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella*
agona.

Lancet 2,490

COY Mc, J. H. 1962

The isolation of *Salmonellae*.

J. appl. Bact. 25,213

DUNN, C. u. W. F. MARTIN 1971

Comparison of media for isolation of *Salmonellae* and
Shigellae from fecal specimens.

Appl. Microbiol. 22,17

EDEL, W. u. E. H. KAMPELMACHER 1968

Comparative studies on *Salmonella* isolation in eight
European laboratories.

Bull. WHO 39,487

EDEL, W. u. E. H. KAMPELMACHER 1969

Salmonella isolation in nine European laboratories using
a standardized technique.

Bull. WHO 41,297

EDEL, W. u. E. H. KAMPELMACHER 1973

Comparative studies on the isolation of "sublethally in-
jured" *Salmonellae* in nine European laboratories.

Bull. WHO 48,167

EDEL, W. u. E. H. KAMPELMACHER 1974

Comparative studies on *Salmonella* isolations from feeds
in the laboratories.

Bull. WHO 50,421

ELLINGSEN, J. u. A. SKOGSHOLM 1962

Salmonellen in Kokosschnitzeln.

Nord. Vet. Med. 14,29

FRIEDRICH, W.

1977

Dekontamination von Salmonellen in Einzelfuttermitteln und Mischfutter durch hydrothermische Behandlung.

MFI Schriftenreihe: Salmonellosen und Futtermittel, Anregung zur Problemlösung.

Fachverband der Futtermittelindustrie, S. 60

FOSTER, E. M.

1971

The control of Salmonellae in processed foods: A classification system and sampling plan.

J. Ass. Off. Analyt. Chem. 54,259

GERICHTER, C. B. u. J. SECHTER 1966

Comparison of methods for the isolation of Salmonellae from bone meal.

Appl. Microbiol. 14,711

GIESE, W., U. REUSSE, C. MESSON

u. J. PRIEBE

1976

Pasteurisierung von Fischmehl durch Bestrahlung.

Zbl. Vet. Med. B., 23,769

GUINÉE, P. A. M.

u. E. H. KAMPELMACHER

1962

Influence of variations of the enrichment method for the detection of Salmonellae.

Antonie van Leeuwenh., 28,417

HEEVER, VAN DEN L. W. u.
H. N. VAN DEN MADE 1977

The effect of sample size and culture method on the recovery of *Salmonella* spp. from naturally contaminated carcase meal.
J. South Afic. Vet. Ass. 48,51

HESS, E. 1979

Epidemiologie und Seuchenprophylaxe mit besonderer Berücksichtigung der Salmonellosen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92,501

HARREWIJN, G. A. u.
D. A. A. MOSSEL 1974

New methods of *Salmonella* isolation.
Lab. Sci. 11,260

HARVEY, R. W. S. u.
S. THOMSON 1953

Optimum temperature of incubation for isolation of *Salmonellae*.
Mon. Bull. Minist. Hlth. 12,149

HARVEY, R. W. S. u.
T. H. PRICE 1967

The isolation of *Salmonellas* from animal feeding-stuffs
J. Hyg. Camb. 65,237

HARVEY, R. W. S. u.
T. H. PRICE 1968

Elevated temperature of enrichment media for the isolation of *Salmonellas* from heavily contaminated materials.
J. Hyg. Camb. 66,377

HARVEY, R. W. S. u.
T. H. PRICE

1977

Observations of pre-enrichment for isolating Salmonellas from sewage polluted natural water using Muller-Kauffmann tetrathionat broth prepared with fresh and desiccated ox bile.

J. appl. Bact. 43, 145

HARVEY, R. W. S. u.
T. H. PRICE

1979

The isolation of Salmonellas from animal feeding-stuffs.

J. appl. Bact. 46, 27

HUHTANEN, C. N. u. J. NAGHSKI 1972

Effect of type of enrichment and duration of incubation on Salmonella recovery from meat and bone meal.

Appl. Microbiol. 23, 578

JACOBS, J., P. A. M. GUINÉE, E. H. KAMPELMACHER
u. A. VAN KEULEN

1963

Studies on the incidence of Salmonella in imported fish meal.

Zbl. Vet. Med. B. 10, 542

JÄNECKE, E.

1980

Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in Tierkörperbeseitigungsanstalten.

Vet. Med. Diss. Hannover

KAMPELMACHER, E. H.

1967

- ohne Titel -

Zbl. Bact. I. Orig. 204, 100

KAMPELMACHER, E. H. 1980

"Mit Salmonellen leben?"
Fleischwirtschaft 60, 1670

KEMPF, G. u. O. PIETZSCH 1981

Salmonellen in Tierkörpermehlen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 10, 189

KLIGLER, I. J. 1917

A simple medium for the differentiation of members of
typhoid-paratyphoid group.
Am. J. Publ. Hlth. 7, 1042

KLIGLER, I. J. 1918

Modification of culture media used in the isolation of
typhoid, dysentery and allied bacilli.
J. exper. Med. 28, 318

KRETZSCHMAR, W., H. WEDEL, W. GNEUSS
u. R. GOTTLÖBER 1974

Über eine massive Salmonella-agona Keimstreuung.
Zschr. f. ges. Hyg. Grenzgeb. 20, 39

LANG, K. 1963

Untersuchungen über die Brauchbarkeit der in der bakterio-
logischen Fleisch- und Lebensmitteluntersuchung verwendeten
Buntplatten.
Fleischwirtschaft 15, 1126

LEISTNER, L., R. DEIBEL, J. JOHANTGES
u. C. NIVEN jr. 1962

Beitrag zur Methodik des Nachweises von Salmonellen.
Fleischwirtschaft 12, 1160

LENGAUER, E. 1978

Kurze Stellungnahme zum Problem "Salmonellenbestimmung in Futtermitteln".

Referat, Arbeitstagung der Internationalen Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung in München, 1978

MAYER, H. 1978

Vorkommen von Salmonellen in inländischen Tierkörpermehlen und sonstigen Futterkomponenten.

Fleischmehlindustrie 30,17

MOSSEL, D. A. A. 1960

Versuchsweise schnelle Erkennung psychotroper Typen unter Enterobakterien von Lebensmitteln.

J. appl. Bact. 23,185

MÜLLER, J. M. u. A. THALMANN 1978

Erfahrungen mit Salmonellen in Futtermitteln.

Referat, Arbeitstagung der Internationalen Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung in München, 1978

MOSSEL, D. A. A. u.
M. A. RATIO 1970

Rapid detection of sublethally impaired cells of enterobacteriaceae in dried foods.

Appl. Microbiol. 20,273

MULINDWA, D. K. u. O. PIETZSCH 1979

Studies of the influence of competitive entero-bacteriaceae flora on Salmonella isolation.

Zbl. Bakter. I. Orig. 243,336

NIEDZBALLA, H. 1966

Über das Vorkommen von Keimen aus der Salmonellagruppe in eingeführten pflanzlichen Futtermitteln unter besonderer Berücksichtigung der Ölpresbrückstände.

Vet. Med. Diss. München

PIETZSCH, O. 1967

Ein Nährboden zur Schwärmverhinderung und gleichzeitigen Unterscheidung der Proteuskeime von Salmonellen.

Fleischwirtschaft 1,23

PIETZSCH, O., F.-J. KRETZSCHMER u.
E. BULLING 1975

Vergleichsuntersuchungen über Salmonella-Anreicherungsverfahren.

Zbl. Bakter. I. Orig. 232,232

PIETZSCH, O. 1976

Futtermittelbehandlung mit ökonomisch tragbaren Methoden.
Bundesgesundhbl. 19,286

PIETZSCH, O. u.
D. K. MULINDWA 1978

Spezielle Aspekte bei der Voranreicherung auf Salmonellen.
Arch. Lebensmittelhyg. 29,145

PIETZSCH, O. 1978

Verbreitung von Salmonellainfektionen bei Tieren, tierischen Lebens- und Futtermitteln in der BRD einschl. Berlin (West).
Bundesgesundhbl. 21,389

PIETZSCH, O. 1979

Jahresbericht 1977
Bundesgesundhbl. 22,153

POELMA, P. L. u.
J. H. SILLIKER 1976

Salmonella. in: SPECK, M. L. (Hrsg.) p. 301
American Public Health Association, Inc. Washington D. C.

POLLOCK, H. M. u.
B. J. DAHLGREN 1974

Clinical evaluation of enteric media in the primary isolation
of Salmonella and Shigella.
Appl. Microbiol. 27,197

PRICE, W. R., R. A. OLSEN u.
J. E. HUNTER 1972

Salmonella testing of pooled preenrichment broth cultures
for screening multiple food samples.
Appl. Microbiol. 23,697

RADAN, M., V. FUCHS, S. BEJERANO
u. S. FINSTERBUSCH 1970

The comparative efficacy of selenits and tetrathionate
media in the isolation of Salmonella from some foods and
feeds of animal origin.
Refuah Vet. 27,14

REUSSE, U. u. A. MEYER 1972

Der "Pril-Mannit-Agar" in der Salmonella-Diagnostik.
Zbl. Bakter. I. Orig. 219,555

REUSSE, U., A. HAFKE u.
A. MEYER 1975

Erfahrungen bei der Isolierung von Salmonellen und Entero-
bacteriaceen.
Arch. Lebensmittelhyg. 26,137

REUSSE, U., A. HAFKE u.
R. GEISTER 1976

Feststellen des Enterobacteriaceengehaltes von Fischmehl
zur Beurteilung der Salmonellenfreiheit.

Zbl. Bakter. I. Orig. 162, 288

REUSSE, U., G. BISCHOFF, G. FLEISCHHAUER
u. R. GEISTER 1976

Pasteurization of fish meal by irradiation Part I,
determination of the minimal radiation dose necessary
to destroy Salmonella in contaminated fish meal.

Zbl. Vet. Med. B. 23, 158

REUSSE, U. 1977

Möglichkeiten der Salmonellendekontamination in Futtermitteln
unter besonderer Berücksichtigung von Propionsäure.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84, 55

REUSSE, U. 1978

Nachweismethoden von Salmonellen und Enterobacteriaceen.

Arch. Lebensmittelhyg. 29, 138

REUSSE, U. 1980

Möglichkeiten der Dekontamination salmonellenhaltiger
Futtermittel.

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 130

RÖHR, W. 1960

Salmonellen in Futtermitteln.

Mh. Vet. Med. 15, 196

ROLLENDER, W., O. BECKFORD, R. D. BELSKY
u. B. KASTROFF 1965

Comparison of xylose lysine desoxycholate agar and Mac
Conkey agar for the isolation of Salmonella and Shigella
from clinical specimens.

Techn. Bull. Reg. Med. Technol. 35, 161

SAKAZAKI, R., S. NAMIOKA, A. OSADA
u. A. YAMADA 1960

A problem on the pathogenic role of Citrobacter of enteric
bacteria.

Japan. J. exper. Med. 30, 13

SCHOTHORST, M. VAN u.
E. H. KAMPELMACHER 1967

Salmonella in meat imported from South American countries.
J. Hyg. Camb. 65, 321

SCHOTHORST, M. VAN u.
F. M. VAN LEUSDEN 1972

Studies on the isolation of injured Salmonella from foods.
Zbl. Bakter. I. Orig. 221, 19

SCHOTHORST, M. VAN, F. M. VAN LEUSDEN, J. JEUNIK
u. J. DE DREU 1977

Studies on the multiplication of Salmonellae in various
enrichment media at different incubation temperatures.

J. appl. Bact. 42, 157

SAARMANN, E. M. 1964

Experimentelle Untersuchungen über die Schwärmhemmung von
Proteus vulgaris auf der Oberfläche fester Nährböden.

Vet. Med. Diss. Hannover

SIEMS, H. 1978

Erfahrungen bei der Isolierung von Salmonellen aus Lebensmitteln unterschiedlicher Risikokategorien.

Zbl. Bakter. I. Orig. 167, 120

SILLIKER, J. H. u.
D. A. GABIS 1974

V. The influence of selective enrichment media and incubation temperatures on the detection of Salmonellae in raw frozen meat.

Can. J. Microbiol. 20, 813

SMITH, D. J. 1977

A standard technique for the isolation of Salmonella from animal feeds.

J. Hyg. 79(3), 449

SMYSER, C. F. u.
SNOEYENBOS 1969

Isolierung von Salmonellen aus Einstreu und Futter.

Avian Dis. 13, 134

SONNTAG, M. 1962

Über den Salmonellenbefall pflanzlicher und tierischer Futtermittel unter besonderer Berücksichtigung von inländischem Knochenfuttermehl und Futterknochenschrot.

Vet. Med. Diss. Gießen

STELLMACHER, W. u. M. RAUKE 1967

Fischmehl und Salmonellen.

Mitt. Hft. Vet. Med. 22, 503

STRAUCH, D., H. SCHWAB u.
W. KÖNIG

1977

Untersuchungen über den Einsatz der Voranreicherung zur
Isolierung von Salmonellen aus Klärschlamm und Kotproben.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90,475

SVEUM, W. H. u. P. A. HARTMANN 1977

Timed-release capsule method for the detection of Salmonellae
in foods and feeds.

Appl. environment. Microbiol. 33,630

TAYLOR, W. J. u.
J. H. SILLIKER

1961

Isolation of Salmonellae from food samples.

Appl. Microbiol. 9,484

TAYLOR, W. J. u. D. SCHELHART 1967

Isolation of Shigella, IV. Comparison of plating media with
stools.

Am. J. clin. Pathol. 48,356

TAYLOR, W. J.

1971

Isolation of Shigella, VIII. Comparison.

Appl. Microbiol. 21,32

THATCHER, F. S. u. D. S. CLARK 1968

Microorganisms in foods: Their significance and methods of
enumeration.

University of Toronto Press VII, 54

TIEFENBACHER, H. 1977

Möglichkeiten der Salmonellenkontamination in Futtermitteln mit organischen Säuren.

MFI Schriftenreihe: Salmonellen in Futtermitteln, Anregung zur Problemlösung, S. 70

TOMPKIN, R. B. 1973

Factors influencing detection of Salmonellae in rendered animal by-products.

Appl. Microbiol. 25,485

WERNERY, U. u.
T. H. ZIMMERMANN 1981

Vergleichende quantitative Untersuchungen zum Nachweis subletal geschädigter Salmonellen in Tierkörpermehlen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94,14

WESSELINOFF, W. u. T. TONEFF 1968

Salmonellen in eingeführten Tierkörpermehlen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 81,426

WILLIAMS, J. E. 1981

Salmonellas in poultry feeds - a worldwide review.

Wld. Poult. Sci. J. 1,6

WOKATSCH, R. u. R. RHODE 1976

Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Nährmedien zur Isolation von Salmonellen in der Routinediagnostik.

Zbl. Bakter. I. Orig. 234,287

ZIMMERMANN, T. u. U. WERNERY 1979

Untersuchungen zum Nachweis durch Hitzebehandlung subletal geschädigter Salmonellen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92,441

VERORDNUNG

1978

Verordnung über die Einfuhr und die Durchfuhr von Futtermitteln tierischer Herkunft und von Knochenmaterial (Einfuhrverordnung Futtermittel tierischer Herkunft).

Bundesgesundhbl. T. I 1978,1375

Frau Professor Gedek danke ich für die Überlassung des Themas und ihre mir immer bereitwillig und freundlich gewährte Unterstützung bei allen Problemen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Kalich für die Bereitstellung eines Laborplatzes und die stets gern erteilte Hilfe und Beratung.

Zuletzt sei auch den Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene gedankt, die mir bei den praktischen Arbeiten immer zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Am 3. September 1954 wurde ich als Sohn des Oberstudien-
direktors Werner Seydel und seiner Ehefrau Hannelore
Seydel, geb. Schenk, in Öhringen (Hohenlonekreis) geboren.

Von 1961 bis 1966 besuchte ich die Volksschule bzw. die
ersten Klassen des Hellenstein-Gymnasiums in Heidenheim,
von 1966 bis 1973 das Staatliche Gymnasium in Sigmaringen.
Dort legte ich 1973 das Abitur ab.

Bei der Bundeswehr verpflichtete ich mich auf 2 Jahre
(1973 - 1975) und war während dieser Zeit in Kempten/
Allgäu stationiert. Im Wintersemester 1975 begann ich an
der Tiermedizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin mein Tiermedizinstudium und bestand hier nach dem
Sommersemester 1977 das Physikum.

Danach setzte ich mein Studium an der Tiermedizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München fort,
wo ich im Oktober 1980 mein Staatsexamen ablegte.

